

Estudio del efecto inhibitorio de anticuerpos anti-gangliósidos asociados al Síndrome de Guillain-Barré sobre la regeneración axonal en el sistema nervioso periférico

por

Biól. María Victoria Rozés Salvador

Director de Tesis: Dr. Pablo H. H. Lopez

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación Médica
Mercedes y Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-UNC



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Córdoba, Argentina
2016**

COMISIÓN ASESORA:

Dr. Gustavo Nores. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas. CIQUIBIC-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Liliana Cancela. Departamento de Farmacología. IFEC-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Belkys Maletto. Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología. CIBICI-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

Defensa oral y pública.

Lugar y Fecha:

Calificación:

Tribunal

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

A mis padres
y a mi hijo Valentín

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente:

-A CONICET por haber financiado mi doctorado y al Instituto Mercedes y Martín Ferreyra por haber sido el lugar donde lo llevé a cabo.

-A mi director, Pablo López, por haberme hecho un lugar en el laboratorio, por la libertad con la que me has permitido trabajar estos años, respetando mis tiempos y forma de trabajo, por todos los momentos de complicidad y disfrute que hemos vivido en la convivencia del laboratorio y por todo lo aprendido.

- A los miembros de la comisión asesora de tesis: Dra. Belkys Maletto, Dra. Liliana Cancela y Dr. Gustavo Nores por su seguimiento, sugerencias y discusiones científicas durante la realización de este trabajo.

-A las amigas de laboratorio que me regaló la ciencia, Anita y Bela, porque gran parte del proceso lo hemos vivido juntas. Gracias por todo lo compartido, por todo lo que he aprendido de ustedes y por lo mucho que nos hemos divertido.

-A mis padres, por su apoyo y aliento. Por hacer siempre un intento por entender mi trabajo, por alegrarse y festejar mis logros, por su invaluable confianza y amor. A lucho, mi hermano, porque sobre todo en mis momentos difíciles has sido un gran apoyo.

-A mi sol, Valentín, por enseñarme todos los días cosas que no se aprenden en ningún libro ni universidad; cosas que tienen que ver con el amor puro e incondicional, con la inteligencia emocional, con lo simple y realmente valioso.

-A Carlos, por su apoyo y confianza, sobre todo estos últimos meses. Por desafiarme y animarme a tener otra mirada de las cosas, a cuestionar, a repensar y el crecimiento que eso conlleva.

-A mis otros amigos que me regaló la ciencia: Majo, Anahí, Flor S, Coti, Franquito, Viqui P, Nahuel, Sole, José, Flor H y Juli S porque compartir estos años con ustedes ha sido hermoso.

-A los que pasaron y los que recién llegan al lab: Euge, Flor H, Andrés, Cristian, Bárbara y Mara, por los momentos compartidos.

-A toda la gente del Instituto Ferreyra, hace ya varios años que formo parte y siempre lo he sentido familiar y lleno de gente hermosa. Quiero agradecer a los técnicos, a Romi, Pato, Eli, Yesi, Mili y Joaquín del bioterio, a Susana, Silvina y Graciela, las secretarias. Especialmente, quiero nombrar a Pepi, Guille, Dami, Favio, Eve, Gonza M, Gonza Q, Nico U, Mariano, Meli, Mari B, Ceci, gente con la que a lo largo de los años he interactuado mucho más y de alguna forma u otra han colaborado con mi trabajo o simplemente hemos festejado logros y compartido buenos momentos y alegría.

-A mis amigos de la facultad: Mery, Mara, Lau C, Lau G, Lau F, Caro F, Ine, Cyn, Flor A, Caro D, Maia y Hernán, por todos estos años de amistad y de compartir tantas cosas y momentos.

Publicaciones derivadas de esta tesis:

- Victoria Rozés Salvador, Florencia Heredia, Andrés Berardo, Anabela Palandri, José Wojnaki, Ana L. Vivinetto, Kazim A. Sheik, Alfredo Cáceres and Pablo H. H. López (2016). **Guillain Barré Syndrome associated anti-glycan antibodies halt axon regeneration by inhibiting microtubule assembly via RhoA-ROCK-dependent inactivation of CRMP-2**. Exp. Neurology doi: 10.1016.

Publicaciones derivadas de colaboraciones:

- Anabela Palandri, Victoria Rozés Salvador, Jose Wojnaki, Ana L. Vivinetto, Ronald. Schnaar and Pablo H.H. Lopez (2015). **Myelin-associated glycoprotein modulates apoptosis of motoneurons during early postnatal development via NgR/p75NTR receptor-mediated activation of RhoA signaling pathways**. Cell Death Dis. 2015 Sep 3; 6:e1876. doi: 10.1038/cddis.2015.228.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ANTECEDENTES | 13 |
| 1. SINDROME DE GUILLAIN-BARRÉ | 14 |
| 1.1 Generalidades | 14 |
| 1.2 Variantes Clínicas..... | 18 |
| 1.3. Gangliósidos | 19 |
| 1.3.1 Generalidades | 19 |
| 1.3.2 Estructura y Función | 20 |
| 1.4 Anticuerpos anti-gangliósidos..... | 21 |
| 2. REGENERACION AXONAL | 24 |
| 2.1 Generalidades | 24 |
| 2.2 Capacidad regenerativas de SNC vs SNP | 24 |
| 2.3 Inhibidores de la regeneración axonal | 25 |
| 2.3.1 Proteínas asociadas a mielina | 25 |
| 2.3.2 Inhibidores asociados a la cicatriz glial | 26 |
| 2.3.3 Moléculas de guía axonal..... | 26 |
| 2.3.4 Factores intrínsecos..... | 27 |
| 2.4 Cono de crecimiento axonal..... | 28 |
| 2.4.1 Estructura | 28 |
| 2.4.2 Citoesqueleto | 29 |
| 2.4.2.1 Microtúbulos | 30 |
| 2.4.2.2 Filamentos de actina | 33 |
| 2.5 Pequeñas GTPasas..... | 35 |
| 2.5.1 Generalidades | 35 |
| 2.5.2 Rho GTPasas | 37 |
| 2.5.2.1 Antagonistas de la vía Rho/ROCK..... | 40 |
| 2.5.3 Rac GTPasas..... | 40 |
| 2.5.4 Cdc42 GTPasas | 41 |
| RESULTADOS | 46 |
| 3. CARACTERIZACION DEL EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-GANGLIÓSIDOS SOBRE EL CITOESQUELETO DEL CONO DE CRECIMIENTO AXONAL EN MODELOS IN VITRO. | 47 |
| 3.1. El anticuerpo 1B7 inhibe la regeneración axonal asociado con el desarrollo de estructuras de tipo end bulb en un modelo de co-cultivo de DRG- nervio ciático..... | 47 |
| 3.2. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 altera el citoesqueleto de conos de crecimiento de cultivos de neuronas DRGs..... | 50 |
| 3.3. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 altera el citoesqueleto de los conos de crecimiento de neuronas DRGs de manera disociada temporalmente. | 56 |
| 4. ESTUDIO DE LOS EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR GENERADOS POR EL ANTICUERPO ANTI-GANGLIÓSIDOS. | 58 |
| 4.1. El anticuerpo 1B7 induce activación tardía de la pequeña GTPasa RhoA. | 58 |
| 4.2. El tratamiento con inhibidores de la vía de señalización de RhoA/ROCK es capaz de prevenir efectos sobre tubulina y filopodios pero no los efectos sobre el colapso de la lamela. | 59 |
| 4.3. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 induce aumento de la fosforilación de la Proteína Mediadora del Colapso-2 en el sitio Treonina 555 dependiente de la actividad de ROCK..... | 64 |
| 4.4. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 inhibe la extensión de neuritas a través de la fosforilación/inactivación de CRMP-2 en la T555 en forma dependiente de la actividad de ROCK. | 65 |

| | |
|---|-----------|
| 5. MODULACION DE LA INHIBICION DE LA REGENERACION AXONAL INDUCIDA POR EL ANTICUERPO ANTI-GANGLIÓSIDOS EN MODELO IN VIVO..... | 69 |
| 5.1. Electroporación in vivo de DRG con la forma mutante de CRMP-2 en el sitio de fosforilación dependiente de ROCK (CRMP-2 T555A) sobrepasa el efecto inhibitorio del anticuerpo 1B7 en un modelo animal de regeneración axonal..... | 69 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 81 |
| Cultivos disociados de neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRGn):..... | 82 |
| Co-cultivo de explanto de DRG-nervio ciático: | 82 |
| Electroporación in vitro:..... | 83 |
| Anticuerpo monoclonal Anti-gangliósidos: | 83 |
| Tratamientos: | 83 |
| Constructos de ADN: | 84 |
| Microinyección de células: | 84 |
| Inmunofluorescencia: | 85 |
| Electroforesis de proteína: | 86 |
| Análisis de morfología de los conos de crecimiento:..... | 87 |
| Estudios de extensión de neuritas: | 87 |
| Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET):..... | 87 |
| Biosensores utilizados para FRET: | 88 |
| Electroporación in vivo:..... | 89 |
| Modelo de Lesión de Nervio Ciático: | 90 |
| Producción de partículas lentivirales transportando secuencias shARN específicas:..... | 91 |
| Análisis estadístico: | 92 |
| REFERENCIAS | 93 |

Abreviaturas

+TIPS: Proteínas de tráfico del extremo más

ADF: Factor depolimerizante de actina

ADP: Adenosina difosfato

AIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda

AMAN: Polineuropatía axonal motora aguda

AMSAN: Polineuropatía axonal motora/sensitiva aguda

ANTI-GgGS: Anti-Gangliósidos

ATP: Adenosina trifosfato

CCGC: Conos de crecimiento

CDPGs: Proteoglicanos conditrin sulfato

CLASP: Proteínas asociadas a CLIPs

CLIPs: Proteínas de unión citoplasmática

CRMPs: Proteínas que median la respuesta del colapso del cono

CSF: Fluído cerebro espinal

DRGs: Ganglios de la raíz dorsal

Ebs: Proteínas de unión al extremo

ESM: Error estándar medio

FRET: Transferencia de Energía Resonante Fluorescente

GAPs: Proteínas de la activación GTP-asa

GDIs: Inhibidores de disociación de nucleótidos guanina

GDP: Guanosina difosfato

GEFs: Factores de intercambio de nucleótidos guanina

GFP: proteína verde fluorescente

GSK3: Proteína kinasa glicógeno sintetasa 3

GTP: Guanosina trifosfato

HS: Suero de Caballo

LIMK: Proteína LIM quinasa

LMD: Latencia motora distal

LOS: Lipopolisacaridos

MAG: Glicoproteína asociada a mielina

MAP 1B: Proteína asociada a microtúbulo 1B

MIA: Inhibidores asociados a mielina

MLC: Proteína miosina de cadena liviana

MLCK: Quinasa miosina de cadena ligera

MTs: Microtúbulos

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NgR1: Receptor de Nogo 1

Omgp: Glicoproteína de mielina del oligodendrocito

P75^{NTR}: Receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75

PaK: Quinasa serina/treonina activada por p21

PirB: Receptor B similar a inmunoglobulina

PKA: Proteína kinasa A

RAGs: Genes asociados a la regeneración

RGMs: Moléculas de guía repulsivas

Rho GTPasas: Rho guanosinas trifosfato

ROCK: Quinasa serina/treonina asociada a Rho

SFB: Suero Fetal Bovino

SGB: Síndrome de Guillaín-Barré

SMF: Síndrome de Miller Fisher WASP: Proteína del Síndrome de WiscottAldrich

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

tCRMP-2: CRMP-2 total

TIAM 1: Proteína de metástasis y linfoma T1

TROY: Receptor de necrosis tumoral

VC: Velocidad de conducción

Resumen

La regeneración axonal es una respuesta de las células nerviosas dañadas necesaria y crítica para la reparación del nervio en neuropatías agudas inmunes humanas, tales como el Síndrome de Guillain Barré (SGB). Muchos estudios clínicos asocian la presencia de anticuerpos anti-gangliósidos (anticuerpos anti-Ggs) con recuperación incompleta en SGB. La transferencia pasiva del anticuerpo monoclonal anti-GD1a/GT1b (clon 1B7) inhibe la regeneración axonal en un modelo animal. Cultivos de neuronas disociadas DRGs (ganglio de la raíz dorsal, por sus siglas en inglés) (DRGn) demostraron que el anticuerpo anti-Ggs inhibe el crecimiento neurítico a través de la vía dependiente de RhoA/ROCK. Sin embargo, los mecanismos moleculares inducidos por el anticuerpo anti-Ggs que desencadenan la activación de RhoA no han sido esclarecidos. Este trabajo explora las bases moleculares del efecto inhibitorio del anticuerpo anti-Ggs sobre la regeneración axonal de neuronas DRGs tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

El efecto del anticuerpo anti-Ggs sobre la dinámica del citoesqueleto en conos de crecimiento (CC) asociado con el efecto inhibitorio sobre la regeneración axonal fue analizada por video microscopía. Encontramos que la inhibición en DRGs inducidas por el anticuerpo monoclonal dirigido contra los gangliósidos GD1a/GT1b (clon 1B7) involucra: i) un colapso temprano de lamela a través de una vía independiente de RhoA/ROCK; ii) una retracción de filopodios dependiente de RhoA/ROCK; y iii) alteraciones en la organización/dinámica de microtúbulos en el cono de crecimiento mediante la fosforilación de la proteína que media la respuesta de colapso del cono 2 (CRMP-2) en la treonina 555 dependiente de la vía de señalización RhoA/ROCK. Estos resultados fueron confirmados en un modelo *in vivo*, donde la inhibición de la regeneración axonal inducida por el anticuerpo anti-Ggs se produjo mediante la fosforilación/inactivación de la proteína CRMP-2 en la treonina 555. En conclusion, este trabajo sugiere que el anticuerpo 1B7 inhibe la regeneración axonal mediante vías dependiente e independiente de RhoA/ROCK a través de la desestabilización de microtúbulos.

Abstract

Axon regeneration is the response of injured nerve cells critical for nerve repair in human acute immune neuropathies, like Guillain Barré Syndrome (GBS). Several clinical studies associate the presence of anti-ganglioside antibodies (anti-Gg abs) with poor recovery in GBS. Passive transfer of mAb (GD1a/GT1b, clone 1B7) halts axon regeneration in experimental models. Cultures of dissociated DRG neurons (DRGn) demonstrated that anti-Gs inhibits neurite outgrowth through a RhoA/ROCK-dependent pathway. However, molecular intermediates between anti-Gg abs and RhoA activation have not been described. This work explores the molecular basis of the inhibitory effect of anti-Gg abs on axon regeneration of DRG neurons (DRGn) both in vitro and in vivo. Time-lapse video microscopy was used to study their cytoskeleton dynamics at growth cones (GC) in DRGn cultures. We now report that axon growth inhibition in DRGn induced by a well characterized mAb targeting gangliosides GD1a/GT1b (clone 1B7) involves: i) an early RhoA/ROCK-independent collapse of lamellipodia; ii) a RhoA/ROCK-dependent shrinking of filopodia; and iii) alteration of GC microtubule organization/and presumably dynamics via RhoA/ROCK-dependent phosphorylation of CRMP-2 at threonine 555. Our results also show that mAb 1B7 inhibits peripheral axon regeneration in an animal model via phosphorylation/inactivation of CRMP-2 at threonine 555.

In conclusion, this work suggest that anti-Ggs ab impair axon regeneration by RhoA/ROCK-dependent and independent signaling pathways.

ANTECEDENTES

1. SÍNDROME DE GUILLAÍN-BARRÉ

1.1 GENERALIDADES

El síndrome de Guillain Barré fue descubierto por primera vez en el año 1916 por los neurólogos Georges Guillaín, Jean-Alexandre Barré y Andre Strohl en dos soldados que presentaban parálisis muscular y arreflexia (ausencia de reflejos) pero que mostraron recuperación espontánea de la enfermedad (Guillaín et al, 1916). Lo que observaron estos neurólogos fue la combinación de un incremento de la concentración de proteínas con un conteo normal de células en el fluido cerebro espinal (CSF, por sus siglas en inglés), o lo que ahora se conoce como disociación albúmina-citosólica; lo cual diferenciaba este síndrome de la poliomielitis (Guillaín et al, 1916).

Luego de numerosos estudios, en la actualidad se acepta que la combinación de debilidad simétrica rápidamente progresiva en las extremidades superiores e inferiores, con o sin alteraciones sensoriales, hipoxia (deprivación de oxígeno), arreflexia y/o ataxia (pérdida de coordinación) en ausencia de reacción celular en el CSF, son los principales síntomas para el diagnóstico clínico del Síndrome de Guillain-Barré (van Doorn et al, 2008). El curso clínico de la enfermedad es monofásico, en donde la máxima severidad se produce dentro de las 4 semanas de instaurados los síntomas clínicos presentándose una resolución espontánea en la mayoría de los pacientes (Figura 1). Sin embargo, se observa una morbilidad de entre 3-10% y un 30% de los pacientes no son capaces de caminar de manera independiente luego de 6 meses. Además, muchos pacientes permanecen con dolor y fatiga muscular que puede durar meses o incluso años (van Doorn et al, 2008).

El GBS es considerada una enfermedad rara, con una incidencia mundial de 1-2 casos cada 100.000 personas por año, siendo más común en hombres que mujeres (con una relación de 3:2). Estudios muestran un aumento de la incidencia lineal con la edad y es menos frecuente en niños que adultos (Sejvar et al, 2011).

De acuerdo con la especificidad del tejido dañado (motor versus sensorial) y el tipo de daño inicial en el nervio (axonal versus desmielinizante), se pueden diferenciar variables o subtipos (se desarrollará en el punto siguiente), las cuales están asociadas no sólo al tipo de recuperación y pronóstico sino también a una distribución geográfica. Está reportado que las variables axonales

prevalecen en Asia, Centro y Sudamérica y las desmielinizantes en América del Norte y Europa (Hadden et al, 1998).

En cuanto a la patogenia de la enfermedad, cerca de dos tercios de los casos de GBS tienen como antecedente una infección dentro de las 4 semanas previas a los síntomas de la misma, generalmente, de las vías respiratorias o gastrointestinales. Los agentes etiológicos comúnmente relacionados con el desarrollo subsecuente de GBS incluyen al virus Epstein-Barr, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* y cytomegalovirus (Hughes & Cornblath, 2005). *Campylobacter jejuni* es la responsable de por lo menos un tercio de los casos de infección que preceden la enfermedad y en este sentido, Miyatake y Yuki han sido pioneros en descubrir que lipopolisacáridos (LOS, por sus siglas en inglés) ubicados en la cara externa de la pared de esta bacteria tienen homología estructural con gangliósidos presentes en los nervios periféricos. Para comprobar esto cultivaron cepas de *C. Jejuni* aisladas de pacientes con GBS y encontraron reactividad contra gangliósidos, en particular GM1 y GD1a (Yuki et al, 1992). Además, también se han encontrado en esta misma cepa genes que codifican para enzimas capaces de transferir ácido siálico a estructuras oligosacáridas, los cuales son importantes para la generación de epítopes similares a gangliósidos (Yuki, 2007). De manera interesante, se ha observado que una misma cepa puede transportar mas de una estructura oligosacárida similar a gangliósidos lo que puede generar la producción de varios anticuerpos anti-gangliósidos de especificidad no relacionada (Yuki, 2007). Estos resultados permitieron proponer la teoría de mimetismo molecular, en la que se plantea que la producción de anticuerpos contra los LOS de los agentes infecciosos presentan reactividad cruzada con carbohidratos presentes en la estructura de los gangliósidos (Figura 2)(Yuki & Hartung, 2012; Yuki et al, 1992). Algunas especificidades de los anticuerpos están asociadas con variantes clínicas del GBS caracterizadas por déficit neurológicos específicos (Kusunoki et al, 2008; Lopez et al, 2008).

En conjunto con la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos, se ha visto que la activación de complemento contribuye a la degeneración nerviosa en el GBS (Willison, 2005). En este sentido, se han reportado estudios en donde el bloqueo de la activación de complemento previene los signos clínicos emergentes mediados por anticuerpos anti-gangliósidos en un modelo ex vivo e in vivo de GBS en ratón (Halstead et al, 2008).

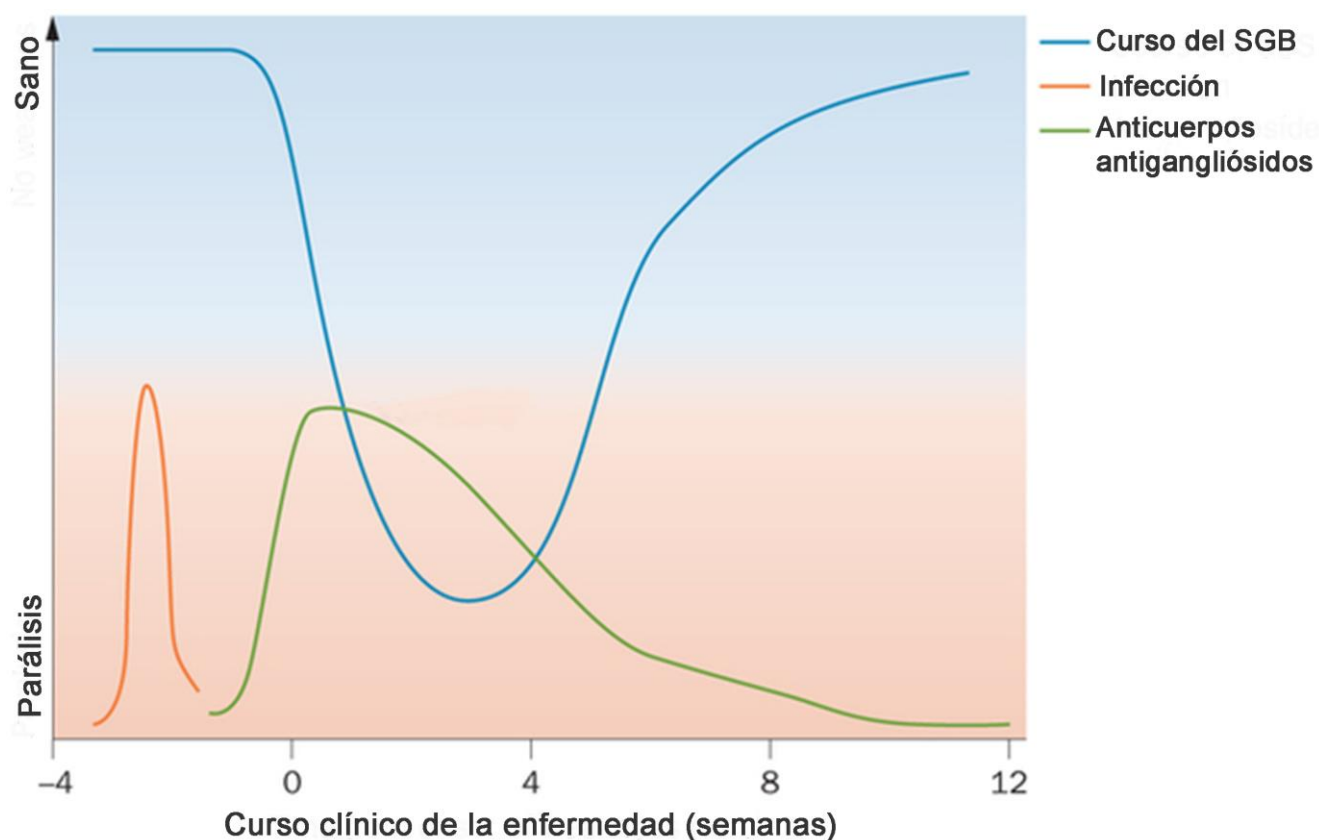


Figura 1: Curso clínico del Síndrome de Guillain-Barré. La mayoría de los pacientes reportan una infección previa al comienzo de la enfermedad. Los títulos de anticuerpos anti-gangliósidos producidos en respuesta a la infección previa comienzan a aumentar previo al desarrollo de la sintomatología clínica y decrecen con el tiempo. La fase aguda de mayor expresión clínica de la enfermedad ocurre dentro de las primeras cuatro semanas. Esquema adaptado de (van den Berg et al, 2014).

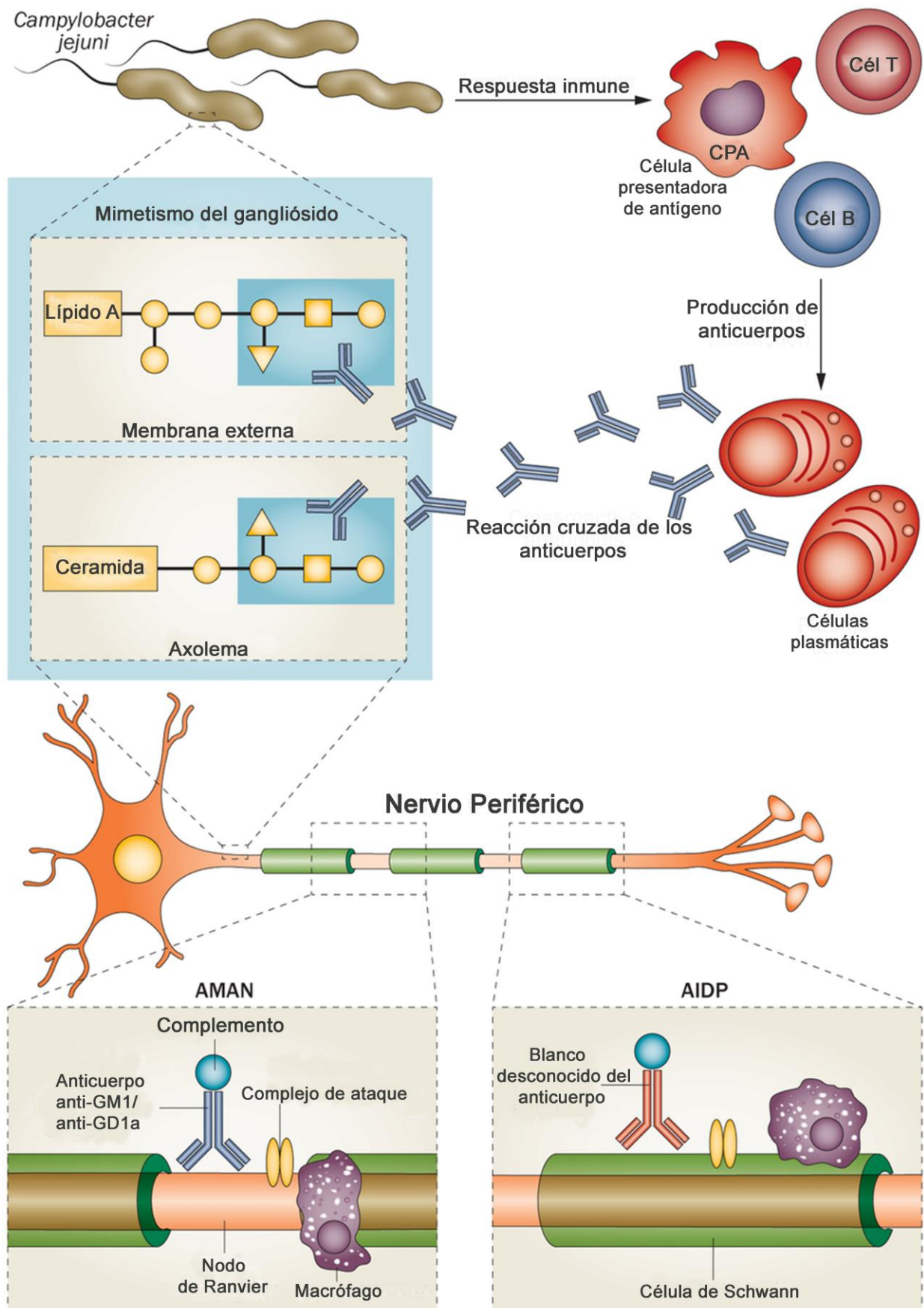


Figura 2: Inmunopatogenia del Síndrome de Guillain-Barré. Representación del mimetismo molecular que ocurre entre anticuerpos producidos contra los lipo-oligosacáridos presentes en la pared del *Campylobacter jejuni* conteniendo homología estructural con carbohidratos que conforman la estructura de los gangliósidos presentes en los nervios periféricos, produciendo de esta forma una respuesta inmune cruzada. Los antígenos blanco en la variante axonal (AMAN) se ubican en o cerca de los nodos de Ranvier. Los anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a se unen al axolema nodal generando la activación de complemento seguido de la formación de un complejo de ataque a la membrana y bloqueo de los canales de Na⁺. Los antígenos blanco de la variante desmielinizante (AIDP), posiblemente se localicen en la vaina de mielina. Los anticuerpos pueden activar complemento, lo que permite la formación del complejo de ataque a la membrana en la cara externa de la célula de Schwann, iniciación de la degeneración vesicular y la invasión de la mielina por parte de macrófagos. Esquema adaptado de van den Berg et al., 2014.

1.2 VARIANTES CLINICAS

Clásicamente el GBS era considerado una polirradiculoneuropatía desmielinizante (afección tanto de raíces como de nervios periféricos) e inflamatoria aguda, con predominio motor y pronóstico benigno en la mayoría de los casos (Hughes, 1992). Sin embargo, es aceptado en la actualidad que existen varios tipos de estas polineuropatías; dentro de las cuales, las más estudiadas son la polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP, por sus siglas en inglés), la polineuropatía axonal motora aguda (AMAN, por sus siglas en inglés) y dentro de ésta, la polineuropatía axonal motora/sensitiva aguda (AMSAN, por sus siglas en inglés) que es considerada una variante severa de AMAN. Por último, también existe una variante no común del GBS llamado Síndrome de Miller Fisher (SMF, por sus siglas en inglés), caracterizado por oftalmoplegia, ataxia y arreflexia (Griffin et al, 1996; Mori & Kuwabara, 2011).

Si bien los síntomas generales del GBS son comunes en todas las variantes, la exploración esencial es el examen neurofisiológico, que en el caso de AIDP demostrará una combinación variable de enlentecimiento de la velocidad de conducción (VC), incremento en la latencia motora distal ((LMD) intervalo entre la aparición del estímulo y el inicio del potencial de acción muscular compuesto resultante) entre otras alteraciones electrofisiológicas (Fernandez et al, 1983; McLeod, 1981). El patrón neurofisiológico en las formas axonales del GBS, AMAN y AMSAN, está caracterizado por ausencia de criterios de desmielinización (VC y LMD normales o levemente alteradas), disminución de la amplitud de los potenciales motores y sensitivos distales, nervios no excitables y electromiograma con potenciales de (Feasby et al, 1986; McKhann et al, 1991).

Otra característica que diferencia estas variantes es que en AIDP los anticuerpos se unen a epítopes que se encuentran en la cara externa de las células de Schwann generando de esta forma la activación de complemento con la subsecuente destrucción de la mielina e invasión de macrófagos. En los casos más severos, mediadores inflamatorios y células pueden inducir daño axonal, un proceso considerado secundario (Hughes & Cornblath, 2005). En cambio, en las formas agudas de AMAN los macrófagos invaden el espacio entre las células de Schwann y el axón, dejando la vaina de mielina intacta y produciendo en la mayoría de los casos bloqueo de la conducción nerviosa y degeneración axonal a nivel distal (Griffin et al, 1996; Hughes & Cornblath, 2005; Vucic et al, 2009).

1.3. GANGLIÓSIDOS

1.3.1 GENERALIDADES

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que tienen uno o más residuos de ácidos siálicos en su estructura, que están ampliamente distribuidos a través de los tejidos del cuerpo, principalmente como componentes de membranas celulares (Lucki & Sewer, 2012). Están expresados predominantemente en tejidos nerviosos y particularmente abundantes en el cerebro, donde constituyen entre el 10-12% del componente lipídico de las membranas neuronales (Ledeen & Yu, 1982; Posse de Chaves & Sipione, 2010). Los gangliósidos se encuentran generalmente anclados en la superficie o cara externa de la membrana plasmática. Están localizados en microdominios de membrana, conocidos como balsas lipídicas, en asociación con otros esfingolípidos y colesterol (Posse de Chaves & Sipione, 2010; Prinetti et al, 2009). Interacciones laterales dentro de estas balsas lipídicas tiene un rol importante en procesos celulares, regulación de la actividad de proteínas de membrana y transducción de señales (Lopez & Schnaar, 2009; Schnaar, 2010; Schnaar et al, 2014). Los gangliósidos contribuyen significativamente a los glicanos de la superficie celular en células neuronales (Kolter, 2012).

1.3.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El sistema nervioso contiene gangliósidos de alta complejidad comparado con otros tejidos (Schnaar et al, 2014). Durante el desarrollo del sistema nervioso, los niveles de expresión y el patrón de gangliósidos cambia considerablemente, ya que en el sistema nervioso embrionario las formas predominantes son los simples GM3 y GD3 y luego el agregado de ácidos siálicos y núcleo tetrasacáridos sobre la ceramida forman los gangliósidos más complejos GM1, GD1a, GD1b y GT1b (Figura 3)(Ngamukote et al, 2007; Sturgill et al, 2012; Yu et al, 1988). Estos cuatro tipos son los que predominan en el sistema nervioso adulto, siendo más del 90% de los gangliósidos presentes en el mismo (Ando et al, 1978; Ogawa-Goto et al, 1994).

Los gangliósidos tienen funciones diferenciales de acuerdo a las interacciones moleculares. Cuando son laterales (*cis*) tienen la función de modular las actividades de las proteínas de señalización en sus propias membranas; mientras que cuando interaccionan con proteínas de membranas opuestas (*trans*) actúan como receptores en el reconocimiento célula-célula (Todeschini et al, 2008). Además, también participan en otras funciones como la modulación de citotoxicidad de células asesinas naturales, son receptores de adhesión celular en proceso de inflamación, controlan interacciones axón-glía, etc. Referido a esto último, ha sido reportado que los gangliósidos GD1a y GT1b presentes en axones son capaces de proteger los axones de insultos tóxicos, participar en la estabilidad del axón-mielina a largo plazo y actuar como receptores funcionales de proteínas presentes en mielina, como el caso de la proteína asociada a mielina (MAG, por sus siglas en inglés), uno de los principales inhibidores de la regeneración axonal (Lopez & Schnaar, 2009; Yang et al, 1996). Estudios muestran que MAG es capaz de inhibir la regeneración axonal en cultivos neuronales primarios mediante la unión a estos gangliósidos (Mehta et al, 2007; Vyas et al, 2002).

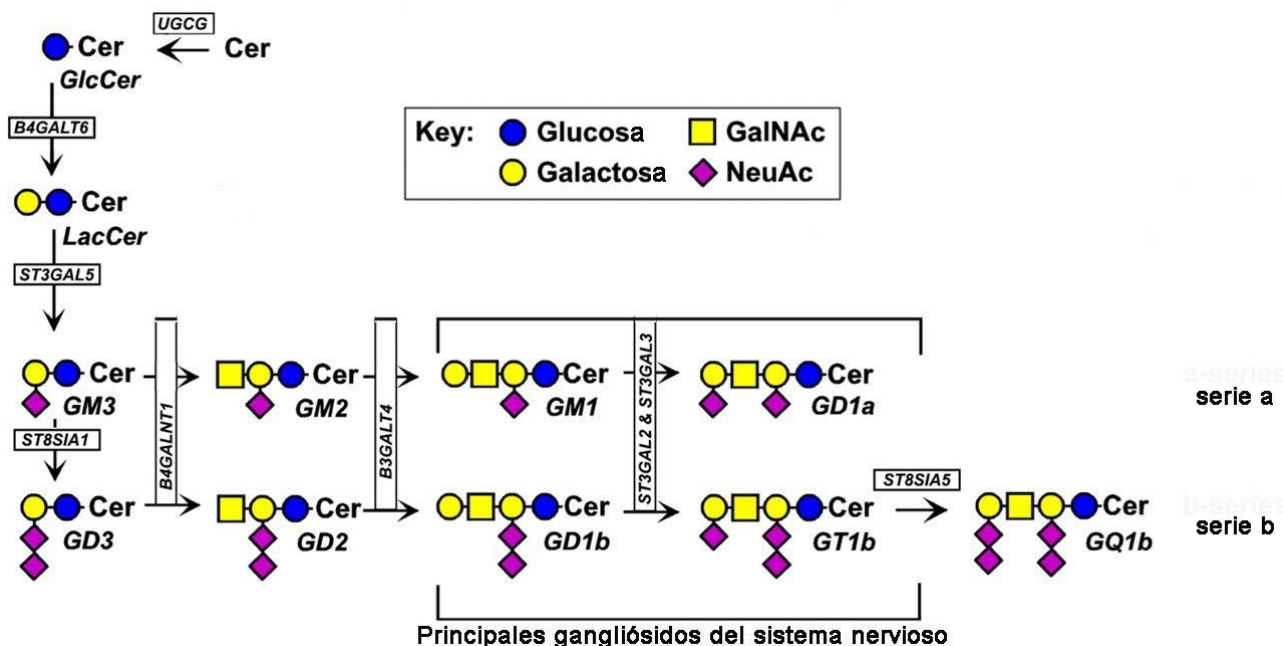


Figura 3: Síntesis de gangliósidos. Representación de la síntesis de los gangliósidos mayoritarios del sistema nervioso. Esquema modificado de Sturgill et al., 2012.

1.4 ANTICUERPOS ANTI-GANGLIÓSIDOS

Los anticuerpos anti-gangliósidos son los marcadores más comunes reconocidos en todas las formas del SGB, por lo que existe un interés considerable por entender los mecanismos moleculares asociados a sus efectos patogénicos. Dos de los gangliósidos mayoritarios del sistema nervioso, GM1 y GD1a, están implicados como gangliósidos blancos de las formas axonales (AMAN) del SGB (Sheikh, 2011). De hecho, anticuerpos anti-GM1 y GD1a son encontrados entre un 50-60% en pacientes con AMAN en Asia. A su vez, anticuerpos anti-GQ1b están presentes entre 80-90% en pacientes que desarrollan el SMF; demostrando esto una fuerte asociación entre anticuerpos anti-gangliósidos específicos y las variantes clínicas de la enfermedad (van Doorn et al, 2008; Willison & Yuki, 2002). De hecho, la inmunización con los gangliósidos GM1 y GD1b ha logrado reproducir la sintomatología clínica y la especificidad de blanco neuronal presente en pacientes con altos títulos de anticuerpos de similar especificidad (Kusunoki et al, 1996; Susuki et al, 2003).

Anticuerpos anti-gangliósidos con especificidad variable también se encuentran en pacientes con AIDP (Hughes et al, 1999). En algunas variantes, la alta densidad del antígeno reconocido por los anticuerpos en el nervio blanco (por ejemplo GQ1b y GalNAc-GD1a) podría ser el factor determinante para la especificidad neuronal (Chiba et al, 1997; Yoshino et al, 2005). Sin embargo la densidad de antígeno no sería suficiente para explicar la especificidad motora asociada con anticuerpos anti-GM1 o anti-GD1a, ya que los nervios sensitivos y motores expresan gangliósidos complejos (GD1a, GM1, GT1b y GD1b) en concentraciones similares (Svennerholm et al, 1994)(Ogawa-Goto et al, 1994). Se ha descrito que la especificidad de blanco neuronal puede definirse tanto por la composición de la membrana celular en la cual el gangliósido se encuentra inserto, la cual determina la conformación del gangliósido expuesto al medio extracelular (conformero); como también por la especificidad de los anticuerpos anti-gangliósidos (requerimiento estructural)(Kaida et al, 2004; Kusunoki et al, 2008; Lopez et al, 2008) . Esto permite concluir que existe una gran variabilidad en la especificidad de los anticuerpos anti-gangliósidos presentes en pacientes con SGB que podría explicar las distintas variantes clínicas asociadas con estos anticuerpos. Esta variabilidad se incrementa al considerar la presencia de múltiples anticuerpos de especificidad variada en un mismo paciente (Lopez et al, 2001) .

Diversos trabajos sugieren que los pacientes con SGB que presentan anticuerpos IgG1 y/o IgM (de vida media larga) contra los gangliósidos GM1 y GD1a son más propensos a presentar mala prognosis y recuperación clínica demorada o más lenta (Annunziata et al, 2003; Bech et al, 1997; Carpo et al, 1999; Gregson et al, 1993; Ilyas et al, 1992; Jacobs et al, 2008; Jacobs et al, 1996; Kuwabara et al, 1998; Press et al, 2001; Simone et al, 1993). Es sabido que falencias en la recuperación reflejan fallas en la regeneración axonal y en la capacidad de reinervación con los blancos correctos en todas las formas del SGB (Brown & Feasby, 1984). En este sentido, ha sido demostrado el rol inhibitorio directo de anticuerpos anti-gangliósidos sobre la regeneración axonal tanto en cultivo de neuronas DRGs como en un modelo animal de regeneración nerviosa periférica caracterizado por la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales o anticuerpos anti-gangliósidos derivados de pacientes con GBS mediante inmunización pasiva de los mismos (Lehmann et al, 2007; Lopez et al, 2010). El modelo *in vivo* consiste en una contusión del nervio ciático que lo daña y consecuentemente genera la apertura temporal de la barrera hemato-nerviosa y de esta manera se permite el ingreso de los anticuerpos en ausencia de un proceso

inflamatorio. En dicho modelo, la inhibición de la regeneración axonal mediada por anticuerpos anti-gangliósidos está relacionada a la presencia de conos de crecimientos distróficos en el sitio de lesión (Figura 4)(Lehmann et al, 2007). El posterior estudio de las vías de señalización celular asociadas con el efecto inhibitorio de anticuerpo anti-gangliósidos demostró que en cultivos de neuronas DRGs, la inhibición del crecimiento neurítico involucra la activación de la pequeña GTPasa RhoA y su quinasa asociada ROCK (Zhang et al, 2011).

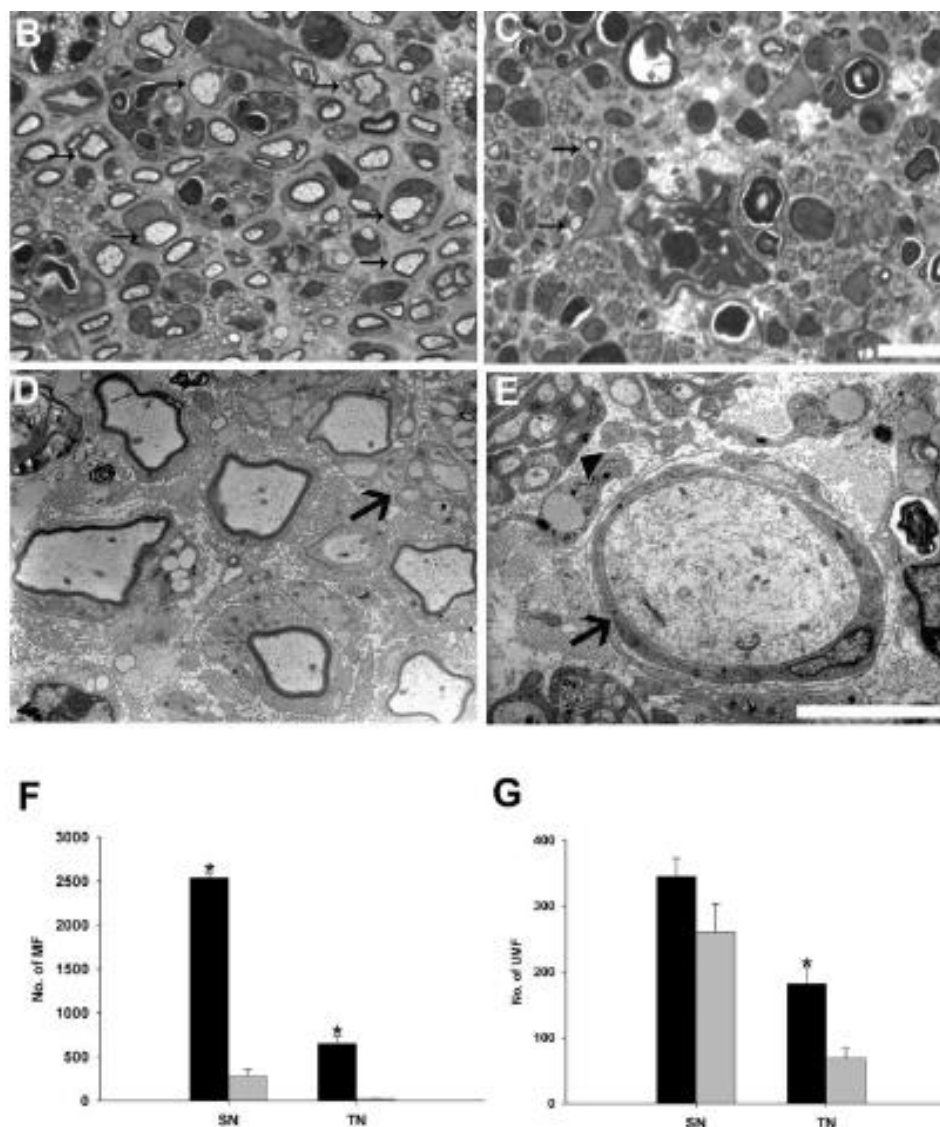


Figura 4: Anticuerpos anti-gangliósidos inhiben la regeneración axonal en nervios periféricos. Resultados obtenidos en un modelo de lesión de nervio ciático y transferencia pasiva del anticuerpo 1B7. B: Microfotografía electrónica. Presencia de numerosos axones mielinizados regenerando en los animales controles (flechas) C: Escasas fibras nerviosas regenerando en los animales tratados con anticuerpo 1B7 (flechas). D: Tanto fibras mielinizadas como amielínicas están presentes en los animales controles (flechas). E: Animales tratados con anticuerpo el 1B7 muestran un conodistrófico y fibras sin mielina. F y G: Disminución significativa del número de fibras mielinizadas (MF) regenerando y amielínicas (UMF) en los animales tratados con el anticuerpo 1B7 (barras grises) en porciones proximales (nervio ciático-SN-) y distales (nervio tibial-TN-) al sitio de la contusión. Figura modificada de Lehmann et al., 2007.

2. REGENERACION AXONAL

2.1 GENERALIDADES

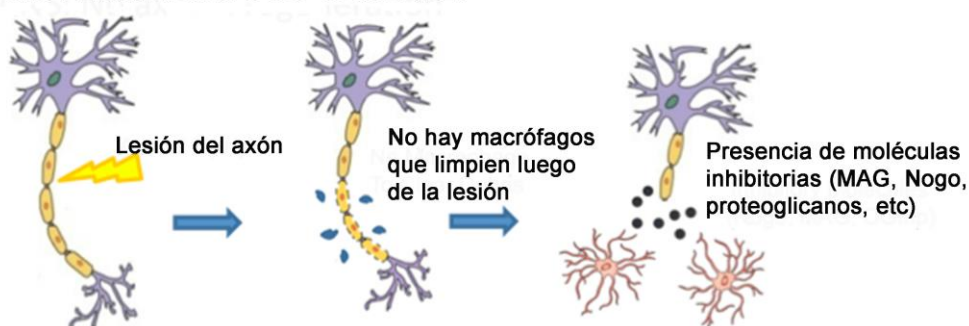
La definición de diccionario de regeneración es mecanismo de reparación autónoma o de restauración de los órganos o tejidos envejecidos, dañados o perdidos. En cuanto a la regeneración axonal, se la considera como la capacidad de un axón a volver a crecer luego de una lesión desde el sitio lesionado. Para que se pueda llevar a cabo dicho proceso a nivel del sistema nervioso periférico, se han descrito una serie de acontecimientos que ocurren luego de la lesión o injuria: el axón y la mielina se fragmentan y los restos celulares son removidos por macrófagos activos. Estos además liberan factores que facilitan a las células de Schwann su proliferación y posterior migración celular y la regeneración axonal. Luego de un tiempo, los axones forman conos de crecimiento y comienzan a crecer a lo largo de bandas de Büngner formadas por las células de Schwann. Estas bandas proveen un ambiente permisivo para el crecimiento de los axones (Gaudet et al, 2011).

2.2 CAPACIDAD REGENERATIVA DEL SNC VS SNP

Luego de una lesión, es crucial recomponer el daño producido en la membrana y transformar al segmento axonal en un cono de crecimiento móvil que puede crecer a través de un entorno local hostil. Opuesto a lo que ocurre en el sistema nervioso periférico (SNP), los axones del sistema nervioso central (SNC) forman conos de crecimiento distróficos o bulbos de retracción, reconocidos como señales de impedimento de la regeneración axonal (Ramón y Cajal, 1928). Luego de que Ramón y Cajal describiera que la regeneración axonal no ocurría de forma espontánea en el sistema nervioso central; Aguayo y colaboradores muchos años más tarde demostraron que neuronas del SNC podían crecer dentro de injertos de nervio periférico atribuyéndolo este crecimiento a factores inhibitorios en el entorno del SNC. Esto pone en evidencia que por un lado, la inhibición de la regeneración en el sistema nervioso central no es una limitación dada por el crecimiento de la neurona y por otro que el entorno juega un rol crucial en este proceso (Figura 5) (David & Aguayo, 1981). Es importante destacar que la capacidad regenerativa del SNP no es del

todo efectiva a pesar de tener un entorno más permisivo. En la actualidad, se han definido factores extrínsecos e intrínsecos que participan en la inhibición de la regeneración axonal en el SNC. Entre los extrínsecos podemos mencionar tres grupos principales: i) inhibidores asociados a mielina, ii) inhibidores asociados con la cicatriz glial que se forma luego de la lesión y iii) inhibidores que funcionan como señales de orientación durante el desarrollo. En cuanto a los intrínsecos, se han descubierto una gran variedad de proteínas y vías de señalización que son activadas luego de una injuria, impidiendo el nuevo crecimiento de axones (Kaplan et al, 2015)

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:



SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO:

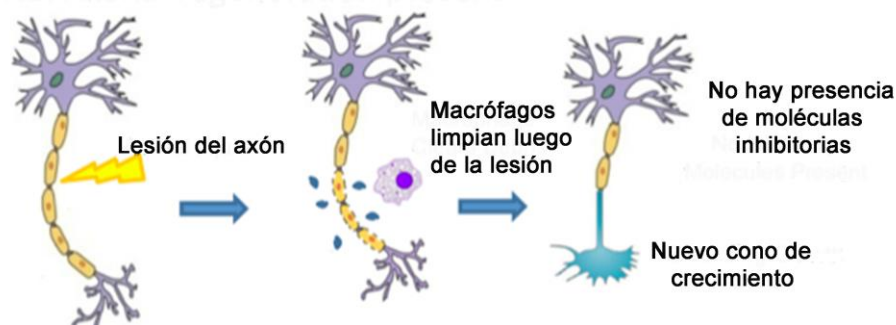


Figura 5: Diferencias en la capacidad regenerativa del SNC vs SNP. El daño en el axón resulta en una deposición de restos de mielina. En el SNP esos restos son rápidamente limpiados por macrófagos, mientras que en el SNC no hay infiltración por macrófagos periféricos. Adicionado a esto, el daño axonal atrae astrocitos que forman una cicatriz glial que impide la reparación del axón dañado a nivel central. Esquema adaptado de Strittmatter S, 2010.

2.3 INHIBIDORES DE LA REGENERACION AXONAL

2.3.1 PROTEINAS ASOCIADAS A MIELINA

Está reconocido que el SNC contiene inhibidores asociados a mielina (MAIs por sus siglas en inglés), entre las que se destacan las proteínas MAG, Nogo y la glicoproteína de mielina del oligodendrocito (Omgp por sus siglas en inglés) (DeBellard et al, 1996; Joset et al, 2010; McKerracher et al, 1994). Se sabe que MAG, Nogo y Omgp comparten la habilidad de unirse a los mismos receptores: el receptor de Nogo 1 (NgR1, por sus siglas en inglés) (Domeniconi et al, 2002; Fournier et al, 2001; Wang et al, 2002) y al receptor B similar a inmunoglobulina (PirB, por sus siglas en inglés) (Atwal et al, 2008) los cuales forman un complejo multimérico con LINGO-1 y el receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75 ó alternativamente al miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral (p75^{NTR} y TROY respectivamente, por sus siglas en inglés) (Yiu & He, 2006). La identificación de estos ligandos y los receptores neuronales que median la inhibición dependiente de mielina ha facilitado el desarrollo de antagonistas selectivos para neutralizar el efecto inhibitorio de proteínas de mielina (Kaplan et al, 2015).

2.3.2 INHIBIDORES ASOCIADOS A LA CICATRIZ GLIAL

Depósitos de matriz extracelular en la cicatriz glial que se forma luego de la lesión en el SNC están altamente enriquecidos en proteoglicanos como condroitin sulfato (CSPGs, por sus siglas en inglés), potentes inhibidores del crecimiento axonal (Fawcett, 2006; Fitch & Silver, 2008). La reacción glial ocurre inmediatamente luego de la lesión como un mecanismo para proteger la salud del SNC del daño inflamatorio (Fitch & Silver, 2008). Múltiples modelos han demostrado que la composición molecular de la cicatriz y la producción de moléculas inhibitorias por astrocitos son factores que contribuyen a la falla regenerativa (Fitch & Silver, 1997; Liu et al, 2006; McGraw et al, 2001; Yiu & He, 2006).

2.3.3 MOLECULAS DE GUIA AXONAL

Estas moléculas tienen un rol central para el crecimiento axonal durante el desarrollo del SNC, y muchas de ellas están expresadas en el cerebro adulto o son reguladas luego de una lesión en el SNC. Cuatro clases de estas moléculas han sido implicadas en la inhibición de la regeneración axonal: netrinas, efrinas, semaforinas y moléculas de guía repulsivas (RGMs por sus siglas en inglés). Las efrinas y su receptor tirosina kinasa forman partes de la familia de proteínas capaces de

generar señalización bidireccional entre las neuronas y la glía y están expresadas en la médula espinal lesionada (Bundesen et al, 2003). Netrina-1 es un ligando bifuncional que puede actuar como quimioattractante o quimiorepelente dependiendo del receptor con el que esté interactuando. Inhibe el crecimiento axonal (Low et al, 2008) mediante la vía de señalización de Rho (Moore et al, 2008). En la familia de las semaforinas, encontramos proteínas solubles y algunas transmembranas. Sema4D es una proteína transmembrana expresada en el oligodendrocito y que inhibe el crecimiento axonal luego de una lesión en el SNC (Moreau-Fauvarque et al, 2003), Sema3A es una proteína soluble asociada a la cicatriz glial (De Winter et al, 2002) y Sema 5A induce el colapso del cono de crecimiento e inhibe el crecimiento de las células del ganglio retinal (Goldberg et al, 2004). Las RGMs están tanto en la guía axonal como el cerramiento del tubo neural. Son potentes inhibidores de la regeneración axonal en el SNC y se ha demostrado que la inhibición de estas promueve el crecimiento axonal y la recuperación luego de una lesión en la médula espinal (Hata et al, 2006).

Un aspecto importante a resaltar en el SNP es que en estudios recientes en donde se examinaron las diferencias en la expresión de factores de crecimiento en vías sensitivas y motoras denervadas, se encontró que las células de Schwann expresan distintos fenotipos sensitivo o motor que influyen en la capacidad para promover selectivamente la regeneración del axón (Brushart et al, 2013; Hoke et al, 2006).

2.3.4 FACTORES INTRINSECOS

Ha sido reportado que lesiones en el SNP desencadenan la activación de genes asociados a la regeneración (RAGs, por sus siglas en inglés), una respuesta limitada en el SNC (Mar et al, 2014). La activación de este programa de crecimiento podría ser una de las responsables en la estimulación del proceso regenerativo en el SNP. Uno de estos genes, c-jun, ha sido demostrado ser crítico para la regeneración axonal y su ausencia produce inhibición y una exacerbada muerte celular luego de una lesión de nervio en ratones (Raivich et al, 2004). Por otro lado, el aumento y mantenimiento de la actividad de la proteína kinasa glicógeno sintetasa 3 (GSK3, por sus siglas en inglés) promueve la regeneración axonal luego de una lesión, através de la vía de PI3K/AKT (Gobrecht et al, 2014) y mediante la inducción de la expresión del gen Smad1 (Saijilafu et al, 2013). También ha sido

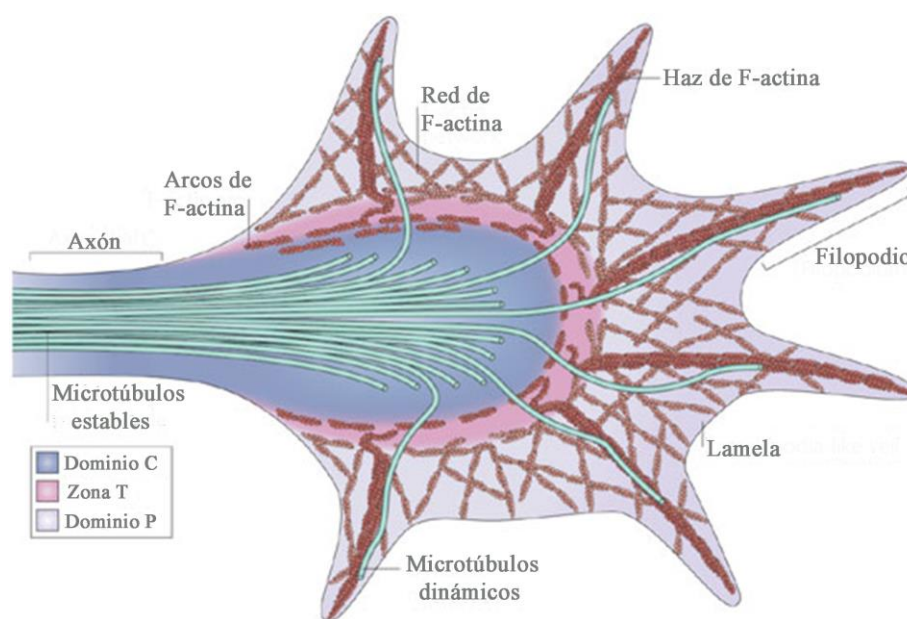
reportado, que los niveles del nucleótido cíclico AMP varían dependiendo del estadio neuronal, y la inhibición del efector aguas abajo de la vía de este nucleótido, la proteína kinasa A (PKA, por sus siglas en inglés), promueve el crecimiento neuronal en presencia de factores inhibitorios como el caso de la proteína MAG (Cai et al, 2001).

Existen numerosos trabajos que relacionan diferentes vías de señalización y proteínas con factores de transcripción y genes que son activados para permitir el proceso de regeneración axonal. Como se mencionó anteriormente, además de estos factores intrínsecos, existen los factores condicionados por el medio en el que se encuentra el axón y la suma de ambos factores es lo que hace tan complejo el escenario de recuperación y crecimiento axonal luego de una lesión, y por consiguiente, el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas (Kaplan et al, 2015).

2.4 CONO DE CRECIMIENTO AXONAL

2.4.1 ESTRUCTURA

El cono de crecimiento es una estructura que se forma en el extremo distal del axón y le permite crecer, elongarse. Su conformación es fundamental para llevar a cabo su función. Dentro del mismo se pueden diferenciar tres zonas o dominios basadas en la organización del citoesqueleto: i) el dominio C o central, formado fundamentalmente por microtúbulos (MTs) estables, ii) la zona T o de transición, también llamado dominio T, se sitúa en la interfase entre los dominios P y C, ocupada por microtúbulos dinámicos y donde estructuras de actomiosina denominadas arcos de actina se encuentran perpendiculares a los haces de F-actina formando un anillo hemicircunferencial dentro de la zona T, y por último iii) el dominio P o periférico, donde se encuentran la red de filamentos de F-actina que forman la lamela y desde allí se extienden los filopodios cuya función es sensar y explorar hacia donde se dirigirá el axón. La dinámica de estos componentes del citoesqueleto determinan el crecimiento en forma de cono y el movimiento durante su viaje (Fig.6)(Lowery & Van Vactor, 2009).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 6: Estructura del cono de crecimiento. En el cono de crecimiento se pueden diferenciar tres zonas o dominios. El dominio más periférico (P), donde se ubican los filopodios y la malla que forma una red de actina llamada lamela. El dominio o zona de transición (T), ocupada por microtúbulos llamados dinámicos que se adentran en la malla de lamela para ayudar a la extensión del cono y por último, el dominio central (C), ocupado por microtúbulos estables que llegan desde el axón hasta la primer parte del cono de crecimiento. Esquema modificado de Lowery et al., 2009.

2.4.2 CITOESQUELETO

El citoesqueleto neuronal está formado por tres clases de filamentos: F-actina, microtúbulos y neurofilamentos, los que proveen soporte estructural intrínseco a lo largo del desarrollo neuronal. El citoesqueleto es crucial para el establecimiento de la forma celular, compartimentalización y polaridad durante la transición de células precursoras esféricas en neuronas maduras. (Coles & Bradke, 2015; Flynn, 2013). Como se mencionó anteriormente, el citoesqueleto del cono de crecimiento está formado por microtúbulos de tubulina y filamentos de actina.

2.4.2.1 MICROTUBULOS

Son polímeros no-covalentes que se encuentran en todas las células eucarióticas y están involucrados en procesos de mitosis, motilidad celular, transporte intracelular, secreción, mantenimiento de la forma celular y polarización celular. Son estructuras polarizadas compuestas por dímeros de α/β tubulina que se ensamblan para formar matrices lineales. Subunidades alternativas de α - y β -tubulina forman un protoplasma, y entre 11 y 15 protoplasmas se asocian lateralmente y forman la pared del microtúbulo (usualmente 13 en células de mamífero) cuyo diámetro es de 25 nm (Downing & Nogales, 1998; Tuszynski et al, 2006; van den Ent et al, 2001). La asociación de $\alpha\beta$ heterodímeros entre la cabeza-cola hace a los MTs estructuras polares y poseen diferentes velocidades de polimerización en los dos extremos. Un tercer isotipo de tubulina, γ -tubulina, se encuentra asociada a los centros organizadores de microtúbulos, lugar donde comienza la nucleación de los mismos y funciona como un templado para el correcto ensamblado de los MTs (Flynn, 2013; Inclán & Nogales, 2001). Durante la polimerización, ambas unidades de tubulina se encuentran unidas a una molécula de guanosina trifosfato (GTP, por sus siglas en inglés). El GTP desempeña una función estructural en la α -tubulina, pero es hidrolizado a guanosina difosfato (GDP, por sus siglas en inglés) en la β -tubulina. Esta hidrólisis modula la adición de nuevos dímeros. Así, el GTP se hidroliza tras un lapso de tiempo, lo que permite que, si la adición de dímeros es rápida, se forme en el extremo (+) un casquete de β -tubulina unida a GTP, mientras que, de ser lenta, lo que se expone es la tubulina unida a GDP. Por lo tanto, la velocidad de polimerización del microtúbulo está dada por la unión de uno u otro nucleótido, en donde un casquete en el extremo (+) con GTP favorece la elongación mientras que uno con GDP, la depolimerización (Weisenberg & Deery, 1976; Weisenberg et al, 1976). La conversión de un estado de crecimiento del MT a uno de contracción, se denomina catástrofe; mientras que el proceso inverso se denomina rescate del MT (Figura 7) (Conde & Cáceres, 2009).

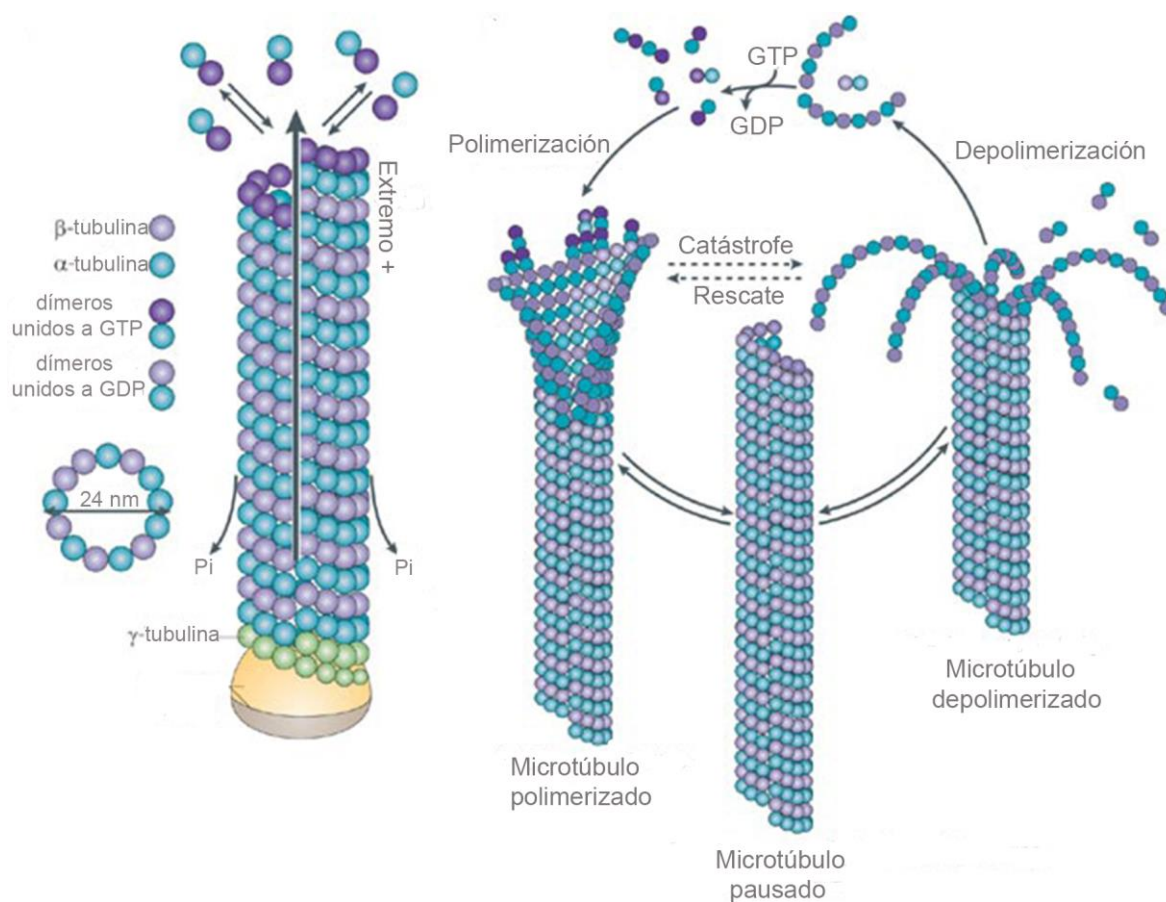


Figura 7: Estructura del microtúbulo. Los MTs están formados por dímeros de α y β tubulina, las cuales cuando están unidas a GTP se fusionan al extremo + del MT contribuyendo al proceso de polimerización del mismo en un proceso llamado rescate del MT. Cuando este dímero se hidroliza, pasa a estar unido a GDP. Si el MT en su extremo contiene mayor cantidad de estos dímeros, comienza a depolimerizarse en un proceso conocido como catástrofe del MT. Esquema modificado de Conde & Cáceres, 2009.

Las propiedades de los microtúbulos dependen de las isoformas de tubulina de las que están compuestos- hay seis α -tubulinas y siete β -tubulinas- y en mamíferos el patrón de expresión de tubulinas es complejo; por ejemplo, en el cerebro, varias isoformas de α y β -tubulinas son expresadas a distintos niveles y en diferentes tiempos. Un simple microtúbulo puede contener heterodímeros de α y β -I, β -II, β -III o β -IV. Sólo la isoforma β -III tubulina muestra expresión exclusivamente neuronal y está aumentada durante el desarrollo pero decrece en la adultez. La composición del heterodímero es importante para la dinámica del microtúbulo, ya que, por

ejemplo, microtúbulos enriquecidos con β -III-tubulina son más estables que los formados por otros isotipos de β -tubulina, sugiriendo una importancia funcional en el desarrollo neuronal (Flynn, 2013; Schwarz et al, 1998). Otro proceso importante que afecta la función del microtúbulo son las modificaciones post-traduccionales que sufren las subunidades de tubulina, tales como tirosinación, detirosinación, acetilación, poliglutamilación, fosforilación, palmitoilación (Barra et al, 1988; Luduena, 1998; Verhey & Gaertig, 2007) y que por lo tanto determinan subpoblaciones de microtúbulos, afectando también su vida media y distribución (Hammond et al, 2008).

Los microtúbulos son bloques de construcción del axón, la extensión del mismo ocurre a través del ensamblado de éstos. Más allá de su papel como andamios estructurales, la remodelación continua de los microtúbulos es vital para el crecimiento y guía de los axones (Dent & Gertler, 2003; Hur et al, 2012; Tanaka & Kirschner, 1991). El dinamismo que presentan les permite explorar constantemente el espacio intracelular, interactuar activamente con moléculas de señalización y someterse rápidamente a su reorganización en respuesta a cambios. Por otra parte, los microtúbulos del cono de crecimiento están asimétricamente distribuidos y la estabilización o desestabilización de un lado del cono de crecimiento es suficiente para inducir atracción o repulsión de giro (Conde & Cáceres, 2009; Hur et al, 2012), lo que sugiere que los microtúbulos desempeñan un papel instructivo en la regulación de la motilidad del cono de crecimiento y posterior crecimiento de los axones (Hur et al, 2012). A su vez, se ha reportado que la modulación de los microtúbulos mediante el uso de una droga estabilizante como es el caso del taxol, tiene el efecto de prevenir la formación de conos de crecimiento distróficos y promover la regeneración axonal luego de una injuria en el nervio (Hellal et al, 2011); mientras que la desestabilización de los microtúbulos mediante el uso de nocodazole, convierte conos de crecimiento en estructuras semejantes a bulbos de retracción e inhibe el crecimiento axonal (Erturk et al, 2007). Estudios recientes demuestran que la inhibición de la detirosinación de microtúbulos mediante el uso de la droga partenolide, promueve la regeneración y funcionalidad nerviosa (Gobrecht et al, 2016). Estos resultados sugieren que la dinámica y estabilidad de los microtúbulos son importantes y determinantes para la correcta formación del cono de crecimiento y posterior regeneración axonal.

Numerosas proteínas se unen a los microtúbulos para llevar a cabo diferentes funciones; algunas los estabilizan, como la proteína asociada a microtúbulo 1B (MAP 1B, por sus siglas en inglés) (Riederer, 2007), algunas actúan como motores, como el caso de dineínas y kinesinas

(Hunter & Wordeman, 2000) , otras son parte de la familia de las llamadas "proteínas de tráfico del extremo más" (+TIPs, por sus siglas en inglés), las cuales están implicadas en el control de la dinámica de microtúbulos y relacionándolos con actina u otras estructuras asociadas a la membrana. Ejemplo de éstas son las proteínas de unión al extremo (Ebs, por sus siglas en inglés); proteínas de unión citoplasmática (CLIP, por sus siglas en inglés); proteínas asociadas a éstas (CLASP, por sus siglas en inglés) (Akhmanova & Hoogenraad, 2005; Akhmanova & Steinmetz, 2008) . Otras son importantes para el crecimiento axonal y ensamblado de microtúbulos, como el caso de CRMP-2, miembro de la familia de proteínas que median la respuesta al colapso (CRMP, por sus siglas en inglés) (Wang & Strittmatter, 1996). El acúmulo de esta proteína en nervios regenerando y su sobreexpresión, aumenta la regeneración axonal en nervios lesionados en neuronas sensitivas y motoras *in vivo* (Rozes Salvador et al, 2016; Suzuki et al, 2003)

2.4.2.2 FILAMENTOS DE ACTINA

La actina es la proteína globular más altamente conservada en las células eucarióticas. En los mamíferos existen tres isoformas de actina: α , β y γ , donde α , y principalmente β son expresadas en neuronas. Bajo ciertas condiciones y suficiente concentración, los monómeros de actina (G-actina) espontáneamente se ensamblan en filamentos (F-actina) de 7 nm de diámetro (Letourneau, 2009). Los filamentos de actina son polímeros polarizados compuestos por monómeros de actina y su formación, estabilidad y destrucción es cuidadosamente regulada en cada estado en el cono de crecimiento. Los monómeros de actina son adicionados al final, y cambios en el equilibrio de la dinámica de polimerización dependen de si esos monómeros están asociados a moléculas de adenosina trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) ó adenosina difosfato (ADP, por sus siglas en inglés) (Flynn, 2013). La actina es abundantemente expresada en todos los tejidos, en donde es crítica para la división celular, adhesión y motilidad. En neuronas, la actina comprende entre el 4-5% del total de proteínas (Clark et al, 1983), mientras que durante el desarrollo del cerebro, su expresión puede llegar a representar el 7-8% del total de proteínas (Santerre & Rich, 1976). La polimerización de actina submembranosa orientada hacia los extremos de los filamentos de actina impulsa la protrusión de la lamela y los filopodios en el borde delantero

de células que migran y los conos de crecimiento de las neuritas (Pollard & Cooper, 2009). El desensamblado de F-actina ocurre en el extremo final del filamento de actina, balanceando el ensamblado de actina en un proceso llamado "treadmilling" en el borde delantero (Wegner, 1976). Este proceso es un componente esencial del flujo retrógrado de actina; base de la que depende el crecimiento neurítico (Figura 8).

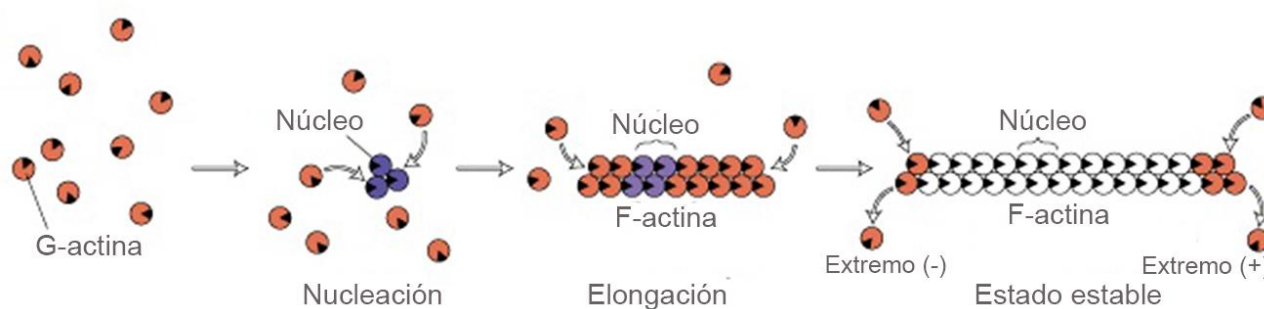


Figura 8: Estructura de los filamentos de actina. Monómeros de G-actina forman primero un núcleo (nucleación) que va a servir como punto inicial para la formación del filamento. Luego se llevará a cabo el proceso de elongación que consiste en el agregados de más monómeros en ambas direcciones. Esquema modificado de (Schafer & Schroer, 1999).

Los filopodios son largos haces de filamentos de actina unipolares que se extienden desde el dominio periférico hasta el dominio de transición del cono de crecimiento. Como se mencionó anteriormente, en el dominio periférico también se ubica la lamela, la cuál está formada por cortas ramificaciones de actina que forman una especie de malla (Hur et al, 2011).

Las propiedades de motilidad y la forma del cono de crecimiento se deben en primera instancia a los rearrreglos de las estructuras de actina. Existe un balance entre la G-actina globular desensamblada y los filamentos de F-actina. Estos pueden ser extremadamente dinámicos en el cono de crecimiento, tanto en la cinética del ensamblado/desensamblado y en como se mueven uno respecto al otro (Flynn, 2013). Los filamentos de actina "nacen" cercanos a la membrana celular por una de las tres diferentes clases de factores de nucleación de actina incluyendo: el complejo Arp2/3, forminas y nucleadores que se unen a los monómeros (Coles & Bradke, 2015; Firat-Karalar & Welch, 2011). Otra proteína que interacciona de manera directa con actina es

cofilina aunque es controversial aún si se la considera una cuarta clase de factor de nucleación in vivo (Pak et al, 2008), pero si es sabido que cofilina provee las piezas de F-actina que sirven como filamentos madres necesarios para la unión y nucleación del complejo Arp 2/3 en las ramas de la lamela (Chen & Pollard, 2013).

En el cono de crecimiento, existe una íntima relación entre los componentes del citoesqueleto que lo conforman. Los haces de filopodios de actina guían el ensamblado de microtúbulos dentro de la zona periférica del cono de crecimiento mientras que el flujo retrógrado de actina controlado por la proteína miosina II, impulsa a los microtúbulos hacia atrás, no dejándolos avanzar y comportándose como una barrera (Medeiros et al, 2006). El bloqueo del flujo retrógrado de actina a través de la inhibición de la actividad de miosina II promueve la extensión de los microtúbulos hacia la periferia del cono de crecimiento tanto en sustratos permisivos como sustratos conteniendo potentes inhibidores del sistema nervioso central (Burnette et al, 2007; Hur et al, 2011).

2.5 PEQUEÑAS GTPasas

2.5.1 GENERALIDADES

Es bien conocido que la superfamilia de pequeñas GTPasas Ras junto con sus reguladores y efectores aguas abajo tienen un rol fundamental en la regulación de numerosos eventos morfogénéticos (Mackay & Hall, 1998). Estas proteínas son interruptores moleculares que utilizan una estrategia bioquímica simple para controlar los procesos celulares. Ciclan entre dos estados conformacionales: uno unido a GTP (estado activo) y el otro unido a GDP (estado inactivo) (Figura 9). En el estado activo, interaccionan con diversas proteínas y generan una respuesta antes que el GTP se hidrolice y vuelvan a su estado de inactivación (Etienne-Manneville & Hall, 2002). En este proceso también están involucrados determinados factores: i) factores de intercambio de nucleótidos guanina (GEFs, por sus siglas en inglés), cuya función es catalizar el intercambio de GDP a GTP para activar la pequeñaGTPasa (Schmidt & Hall, 2002), ii) proteínas de la activación GTP-asa (GAPs, por sus siglas en inglés), que catalizan el intercambio de GTP a GDP, inactivando la pequeña GTPasa y por último, iii) los inhibidores de disociación de nucleótidos guanina (GDIs, por

sus siglas en inglés) cuyo rol es el bloqueo espontáneo de la activación de la proteína (Olofsson, 1999).

El citoesqueleto, como se hizo referencia anteriormente, participa en una variedad de funciones biológicas importantes para las células eucarióticas. Además de proporcionar un marco estructural alrededor del cual se definen la forma celular y la polaridad, sus propiedades dinámicas proporcionan la fuerza motriz para que las células se muevan y dividan. Avanzar en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos que controlan la organización del citoesqueleto es un gran reto para la biología celular. Los miembros de la familia de las Rho guanosinas trifosfato (GTPasas, por sus siglas en inglés)(entre las que más se destacan y conocen son Rho, Rac y Cdc42) emergieron como reguladores claves del citoesqueleto y además, a través de su interacción con múltiples proteínas diana, aseguran el control coordinado de otras actividades celulares, tales como la transcripción de genes y la adherencia (Mackay & Hall, 1998).

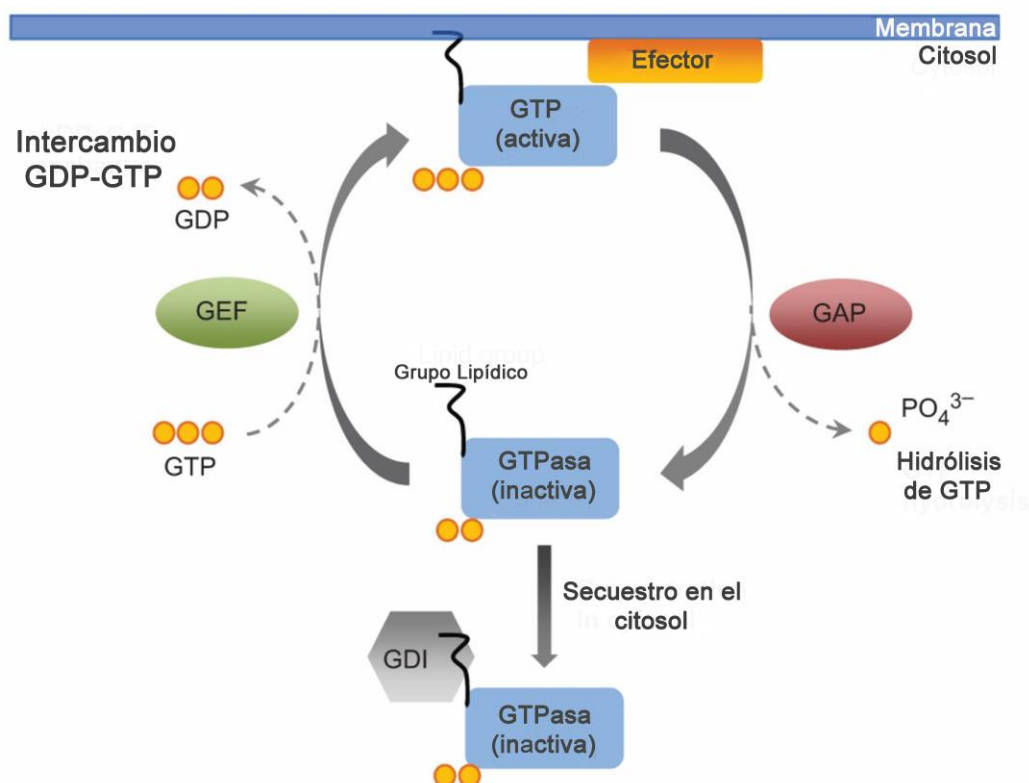


Figura 9: Regulación de la actividad de Rho GTPasas. Las Rho GTPasas inactivas (Rho-GDP) son removidas de la membrana plasmática por Rho-GDIs mediante un mecanismo poco conocido. En el citosol los RhoGDIs evitan la degradación de las Rho GTPasas por los proteosomas. La liberación de GDP es un proceso espontáneo pero lento. Los GEFs aceleran el intercambio de nucleótidos sin una preferencia por un nucleótido particular, ahora bien, ya que la concentración de GTP es mucho mayor que la de GDP, los GEFs promueven la activación de las Rho GTPasas. Los GAPs promueven la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas inactivándolas. Esquema adaptado de (Bento et al, 2013).

2.5.2 Rho GTPasas

Existen tres isoformas de esta proteína: A, B y C. Son enzimas intracelulares claves que regulan la mecánica del citoesqueleto y la motilidad celular (Mackay & Hall, 1998). Modificaciones post-traduccionales diferenciales de las isoformas están relacionadas con su localización subcelular y sus funciones. Mientras que RhoA y RhoC están localizadas en la membrana plasmática o el citoplasma, RhoB está mayoritariamente localizada en la membrana y en compartimentos endolisosomales para degradación (Perez-Sala et al, 2009).

Estas proteínas están altamente expresadas en el sistema nervioso, tanto en neuronas como en células de la glía. Si bien todas han sido implicadas en numerosas funciones, RhoA ha sido la más estudiada. Numerosos trabajos sugieren que RhoA y su principal efector aguas abajo, la quinasa serina/treonina asociada a Rho (ROCK, por sus siglas en inglés) (Riento & Ridley, 2003) están involucradas y actúan en gran parte de la morfogénesis neuronal, desde los procesos de neurogénesis y migración a formación dendrítica y plasticidad sináptica (Gonzalez-Billault et al, 2012). Existen dos isoformas de ROCK, ROCKI y ROCKII, teniendo esta última, mayor expresión en el sistema nervioso. (Duffy et al, 2009). Se ha visto la participación de esta vía también en procesos de inhibición de la regeneración axonal, ya que factores que inducen el colapso del cono de crecimiento y retracción de neuritas como el ácido lisofosfatídico (LPA) (Jalink et al, 1994) y Nogo (Fournier et al, 2000) o moléculas que inhiben la guía axonal como netrina (Murray et al, 2010) o Semaforina 3A (Aizawa et al, 2001) actúan a través de esta cascada de señalización.

Como se mencionó anteriormente, luego de una lesión del SNC, proteínas de mielina activan RhoA a través de la interacción con un complejo de receptores donde se encuentra la familia de receptores de neurotrofinas p75^{NTR} y TROY. La sobreexpresión de p75^{NTR} es suficiente para activar RhoA endógena en células neuronales (Yamashita et al, 1999), la cuál mediante la posterior

activación de ROCK media el efecto inhibitorio. Se han identificado una serie de proteínas (efectores aguas abajo) que interaccionan con ROCK y que son claves para promover/inhibir la regeneración axonal. Una de estas, es la proteína LIM quinasa (LIMK, por sus siglas en inglés), que fosforila e inactiva al factor depolimerizante de actina (ADF, por sus siglas en inglés) y a cofilina, estabilizando los filamentos de actina en el cono de crecimiento lo que resulta en la inhibición del crecimiento neurítico (Bamburg, 1999; Bamburg & Bernstein, 2010). Por otro lado, la fosforilación/inhibición de la proteína cadena liviana de miosina, la cuál es un componente regulatorio de la miosina (MLC, por sus siglas en inglés) está incrementada luego de una lesión en el SNC.

La inhibición de miosina IIA ó el tratamiento con un inhibidor de ROCK (Y-27632, se mencionará en el siguiente punto) previene la inhibición del crecimiento neurítico inducido por moléculas de guía repulsivas (Kubo et al, 2008). Estos resultados indican que ROCK induce la fosforilación de MLC mediante un evento que desencadena la activación de miosina IIA y que este efecto es esencial para la inhibición del crecimiento neurítico producido por las moléculas de guía repulsivas (Kubo et al, 2008). Por último, se ha reportado que miembros de la familia de las CRMPs, en especial las proteínas CRMP-2 y CRMP-4 tienen un rol importante en el crecimiento axonal mediante el ensamblado y estabilidad de MTs uniéndose a heterodímeros de α/β tubulina (Khazaei et al, 2014; Tan et al, 2015; Wang & Strittmatter, 1996). De hecho, la fosforilación/inactivación de CRMP-2 en la treonina 555 dependiente de ROCK media el colapso del cono de crecimiento en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal inducida por LPA o EfrinaA5 (Arimura et al, 2000; Arimura et al, 2005; Mimura et al, 2006) (Figura 10).

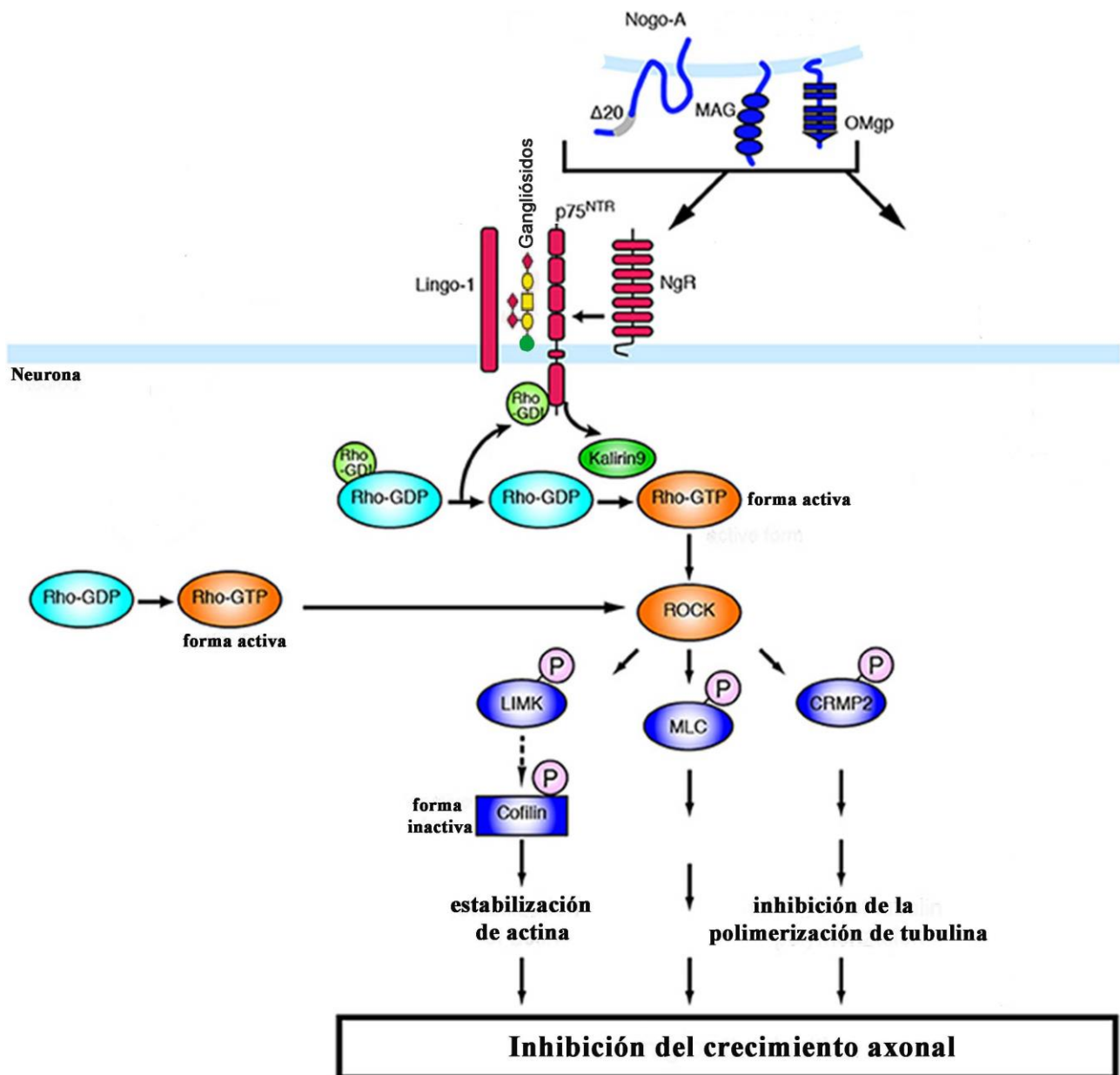


Figura 10: Mecanismos moleculares de inhibición de la regeneración axonal mediada por la vía RhoA/ROCK en el SNC. La presencia de inhibidores asociados a mielina como Nogo, OMgp y MAG, los cuales se unen a los receptores NgR1 y Lingo-1, desencadenan transducción de señales que en la actualidad se sabe que en su mayoría utilizan la vía clásica de inhibición de la regeneración axonal mediada por RhoA/ROCK. Aguas abajo ROCK es capaz de interaccionar con proteínas como LIMK, MLC y CRMP-2 para producir efectos sobre el citoesqueleto de actina y tubulina impidiendo de esta manera que el axón pueda volver a crecer luego de una lesión. Esquema modificado de Fujita y Yamashita, 2014.

2.5.2.1 ANTAGONISTAS DE LA VÍA Rho/ROCK.

La vía de señalización RhoA/ROCK es un punto de convergencia de múltiples señales, entre ellas la inhibición de la regeneración axonal luego de una lesión en el sistema nervioso (McKerracher et al, 2012). Por lo tanto, se ha generado mucho interés en la identificación de los componentes capaces de antagonizar dicha vía. En relación a esto, se ha identificado la enzima C3 transferasa, derivada de *Clostridium botulinum*, la cual es capaz de inhibir selectivamente a Rho sin afectar a otras GTPasas (Forgione & Fehlings, 2014). La primera evidencia que indicó la habilidad de esta enzima para promover la regeneración axonal *in vivo* se realizó en un modelo de injuria del nervio óptico (Lehmann et al, 1999). Otros trabajos en modelos de lesión de la médula espinal en roedores, revelaron que C3 promueve la regeneración luego de la lesión, revirtiendo la activación de Rho, y previniendo la muerte dependiente del receptor p75^{NTR} (Dubreuil et al, 2003). Por otro lado, la familia de quinasas asociadas a Rho, ROCK1 y ROCK2, son efectores de RhoA e importantes reguladores del crecimiento neuronal también relacionadas a otros numerosos procesos fisiológicos. En este sentido se ha descripto la eficacia en numerosos modelos del inhibidor de ROCKs, Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4piridil) ciclohexanocarboxamida) (Forgione & Fehlings, 2014; McKerracher et al, 2012). Este compuesto inhibe ROCKs por competición de su sitio de unión a ATP (Darenfed et al, 2007). Si bien los estudios de inhibición farmacológica han contribuido en gran medida a la comprensión de la biología de ROCK y han permitido considerar a Y-27632 como un potencial agente terapéutico, el mecanismo molecular de acción aún no ha sido completamente definido.

2.5.3 Rac GTPasas

Los miembros de la familia de las Rac GTPasas están implicados en varios aspectos de la morfogénesis neuronal, desde proliferación y migración a plasticidad sináptica. Existen tres genes en vertebrados que codifican para las proteínas Rac1, Rac2 y Rac3 y comparten entre el 88-92% de identidad de secuencia (Corbetta et al, 2005). Ha sido descripto que Rac2 está expresada en células hematopoyéticas (Didsbury et al, 1989) mientras que Rac1 y Rac3 se expresan diferencialmente de algunas regiones del sistema nervioso, como el cerebelo. Se sabe que la localización de Rac3 en la membrana plasmática es independiente de su estado de activación mientras que la forma inactiva

de Rac1 se localiza en el citoplasma y trasloca a la membrana plasmática cuando se activa (Wennerberg & Der, 2004). Rac1 es el miembro de esta familia más ampliamente estudiado.

Se ha reportado que Rac1 está presente en conos de crecimiento regulando la adhesión y las actividades de navegación del cono (Lowery & Van Vactor, 2009). El rol que tiene esta proteína en neuritogénesis y crecimiento axonal ha sido estudiado y demostrado en líneas celulares y en cultivos primarios neuronales. La diferenciación de la línea celular neuronal PC12 requiere de la activación de Rac1 por un mecanismo que involucra la inactivación de RhoA (Nusser et al, 2002). En cultivos primarios se ha demostrado que la sobreexpresión de Rac1 o uno de sus principales GEFs, la proteína de metástasis y linfoma T1 (TIAM1, por sus siglas en inglés), aumenta la elongación axonal mediante expansión de la lamela de actina en el cono de crecimiento (Ehler et al, 1997; Kunda et al, 2001).

Es importante resaltar que el mecanismo de acción de las pequeñas GTPasas puede tener características contradictorias y esto se debe en parte a las combinaciones de GEFs/GAPs posibles. Varias de estas GTPasas (con funciones antagónicas) pueden ser activadas como consecuencia de una misma señal. Por ejemplo, efrinaA4 produce activación de RhoA, inactivación de Rac ó activación de Rac, dependiendo de los receptores o los GEFs/GAPs que estén involucrados (Koh, 2006) ya que hay cerca de 70 GEFs y 80 GAPs descritos en mamíferos (Heasman & Ridley, 2008).

2.5.4 Cdc42 GTPasas

Las proteínas Cdc42 están involucradas en la regulación de la morfología celular, específicamente estimulando la formación de filopodios, probablemente a través de la asociación con la proteína del síndrome de Wiscott Aldrich (WASP) (Machesky & Insall, 1998; Miki et al, 1998). Está reportado que existen dos isoformas de esta proteína que se generan como consecuencia de corte y empalme alternativo en el mismo gen. La forma más estudiada (Cdc42p, Cdc42Hs ó Cdc42a) se expresa de manera ubicua mientras que la otra forma (Cdc42p, Cdc42b ó G25K) es exclusiva de cerebro (Marks & Kwiatkowski, 1996; Nicole et al, 1999).

No sólo la ubicación espacial y modulación de actina es lo que indicaría la relación entre Rac1 y Cdc42, sino también el hecho de compartir un mismo efector común, la serina/treonina quinasa activada por p21 (Pak, por sus siglas en inglés) (Manser et al, 1994). Existen tres isoformas de esta

quinasa: Pak1, Pak2 y Pak3, las cuales fueron primero estudiadas como efectores de Rac1 y luego se encontró su relación con Cdc42 (Nikolic, 2002). Pak tiene numerosos blancos, incluyendo LIMK (Manser et al, 1994) y la quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK, por sus siglas en inglés) (Sanders et al, 1999). Pak activa LIMK, que a su vez inhibe a cofilina para reducir la rotación de filamentos de actina. La inhibición global de cofilina puede probablemente reducir la motilidad mediante la falta de monómeros de actina, pero la inhibición local de cofilina, puede servir como medio eficaz de redistribución de actina dentro del cono de crecimiento (Dickson, 2001).

OBJETIVOS E HIPOTESIS

Problema

El Síndrome de Guillain-Barré es la principal causa de parálisis flácida aguda luego de la erradicación de la poliomielitis. Si bien su incidencia es baja, nuevos casos se detectan cada año en sus principales formas: desmielinizantes (AIDP) y axonales (AMAN) siendo esta última la más severa y con peor pronóstico y mayores secuelas. Es conocida como una enfermedad autoinmune monofásica precedida por infecciones de las vías respiratorias o gastroenteritis resultando en una reacción inmune cruzada entre estructuras de la pared de los agentes causales de las infecciones y gangliósidos presentes en los nervios. En el curso clínico de la enfermedad, los pacientes presentan un pico de altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos que luego decae permitiendo la resolución espontánea de la misma. Sin embargo existe un porcentaje de estos pacientes (30% aprox.) que permanece con títulos altos, lo que está asociado a una mala prognosis y recuperación clínica incompleta o demorada. Se ha relacionado a anticuerpos anti-gangliósidos con inhibición de la regeneración axonal periférica. Por otro lado, se ha visto que el daño axonal produce apertura transitoria de la barrera hemato-nerviosa, lo cual permitiría el ingreso de anticuerpos anti-gangliósidos y su interacción con los gangliósidos presentes en la membrana del axón. Por tanto, estudiar y comprender el rol patogénico y los mecanismos moleculares de la inhibición de la regeneración axonal producida por anticuerpos anti-gangliósidos es clave para poder avanzar en la comprensión de la enfermedad y posteriormente descubrir posibles estrategias terapéuticas.

Hipótesis

Se postula que el anticuerpo anti-gangliósidos 1B7 posee un rol inhibitorio sobre la regeneración axonal generado a través de la modulación del citoesqueleto axonal de actina y tubulina, el cual es facilitado por la ausencia transitoria de una barrera hemato-nerviosa funcional durante el proceso de regeneración.

Objetivos específicos

- I- Caracterización del efecto del anticuerpo anti-gangliósidos 1B7 sobre el citoesqueleto del cono de crecimiento axonal en modelos "in vitro".
- II- Estudio de los eventos de señalización intracelular generados por el anticuerpo anti-gangliósidos 1B7.
- III- Modulación de la inhibición de la regeneración axonal inducida por el anticuerpo anti-gangliósidos 1B7 en un modelo *in vivo*.

RESULTADOS

3. CARACTERIZACION DEL EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-GANGLIÓSIDOS 1B7 SOBRE EL CITOESQUELETO DEL CONO DE CRECIMIENTO AXONAL EN MODELOS IN VITRO.

3.1. El anticuerpo 1B7 inhibe la regeneración axonal asociado con el desarrollo de estructuras de tipo end bulb en un modelo de co-cultivo de DRG- nervio ciático.

Para comenzar con esta caracterización, se desarrolló un modelo “ex-vivo” de co-cultivo de DRG con segmentos de nervio ciático, el cuál consistió en cultivos de explantos de DRGs con segmentos de nervio ciático puestos en proximidad para permitir la regeneración de los axones de las neuronas sobre el nervio. Los mismos fueron cultivados por un período de 72h, tiempo suficiente para permitir la regeneración axonal a lo largo del segmento. A las 24 y 48 h de cultivo el nervio fue tratado con 1µl de IgG control ó anticuerpo 1B7 (1 mg/ml) mediante la aplicación directa sobre la superficie del mismo y a las 72 h fueron fijados. Para la visualización de los axones, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo anti-β-III-tubulina (clon TUJ-1) (Figura 1A). Se obtuvieron imágenes de los cultivos mediante reconstrucción por microscopia confocal y se procedió al análisis de las imágenes cuantificando los axones presentes a 100 µm desde el comienzo del segmento del nervio próximo al DRG (Figura 1B). Se encontró que el anticuerpo 1B7 tuvo un efecto inhibitorio sobre la regeneración axonal en los segmentos del nervio de aproximadamente un 70% en comparación con los cultivos tratados con IgG control.

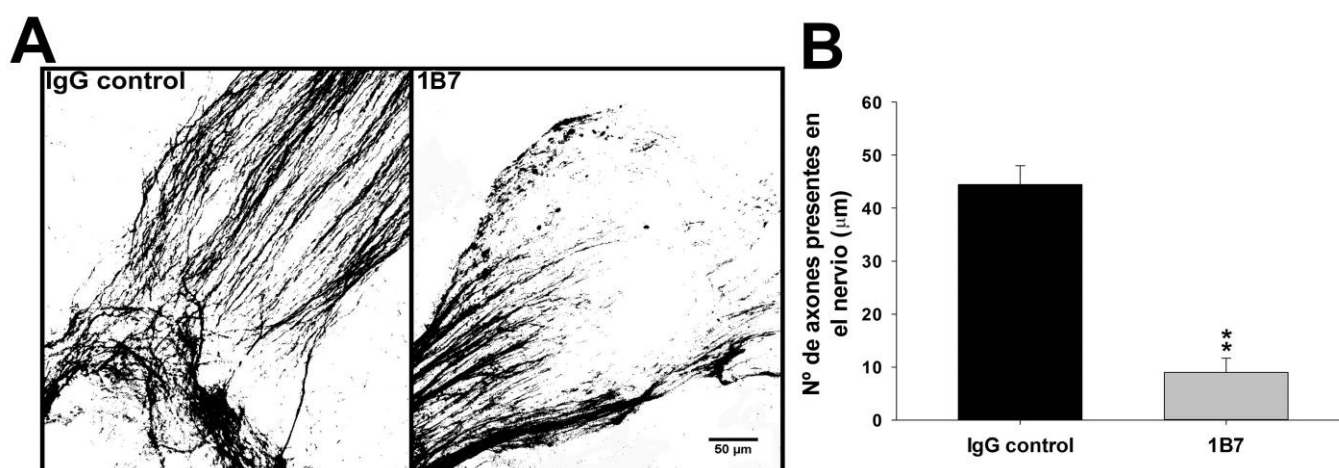


Fig.1: Inhibición de la regeneración axonal producida por el anticuerpo 1B7. A: Microfotografías de co-cultivo de DRG-nervio tratados con IgG control o anticuerpo 1B7 sobre el nervio a las 24 y 48 h. B: Cuantificación del número de axones presentes en el nervio a 100 µm desde el comienzo del segmento del nervio próximo al DRG, utilizando el programa ImageJ. ** p<0,01 comparado con el control; n: 7 en cada grupo, T de Student. Las barras indican el ESM (error estándar medio).

Posteriormente, con el propósito de analizar en mayor detalle la morfología de los axones inhibidos, se obtuvieron imágenes a mayor aumento (objetivo 100X, NA 1.42) de los conos encontrados en los extremos de los axones (Figura 2A). En estos se cuantificó la intensidad de la marca de β -III-tubulina y el tamaño de los conos fue medido como la relación entre el diámetro del cono/axón (Erturk et al, 2007) (Figura 2B y C). Como resultado, se encontró que los axones inhibidos por efecto del anticuerpo 1B7 presentan conos de crecimientos de tipo distróficos, caracterizados por aumento en la intensidad de fluorescencia para la marca de tubulina y mayor tamaño comparado con los tratados con IgG control. Lo interesante de este resultado es haber encontrado estructuras semejantes a los descritos en el modelo de transferencia pasiva en SNP y a los descritos por Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1916) en el SNC luego de una lesión.

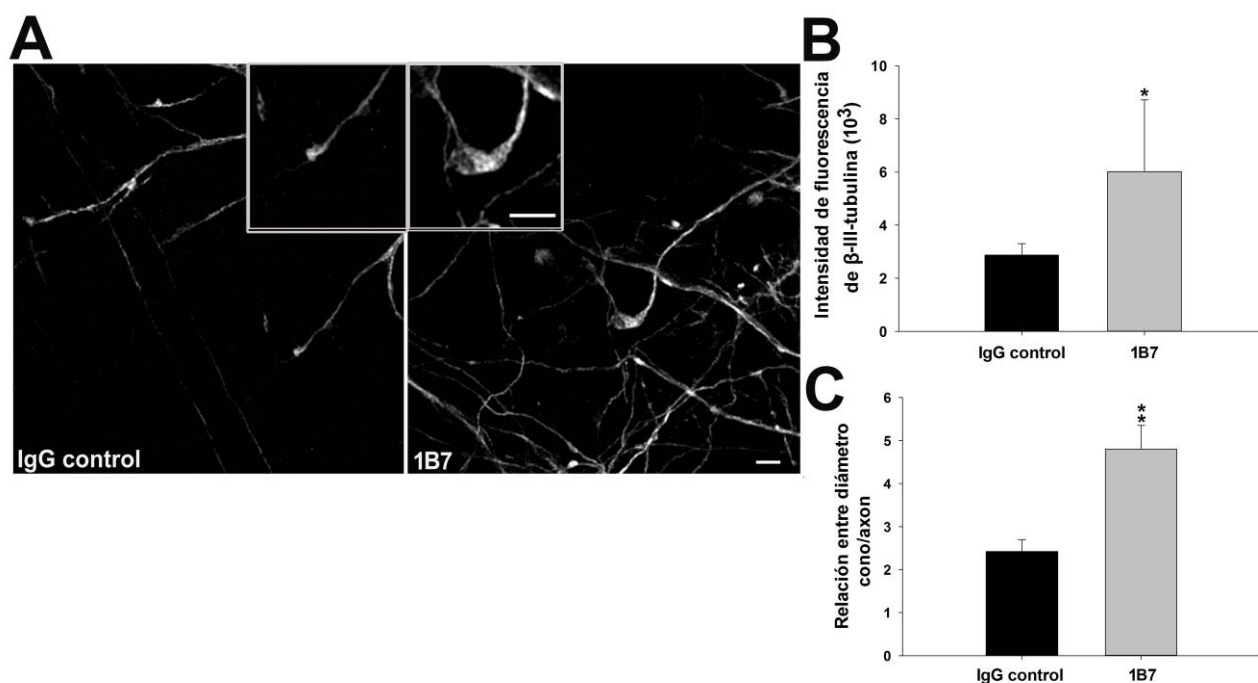
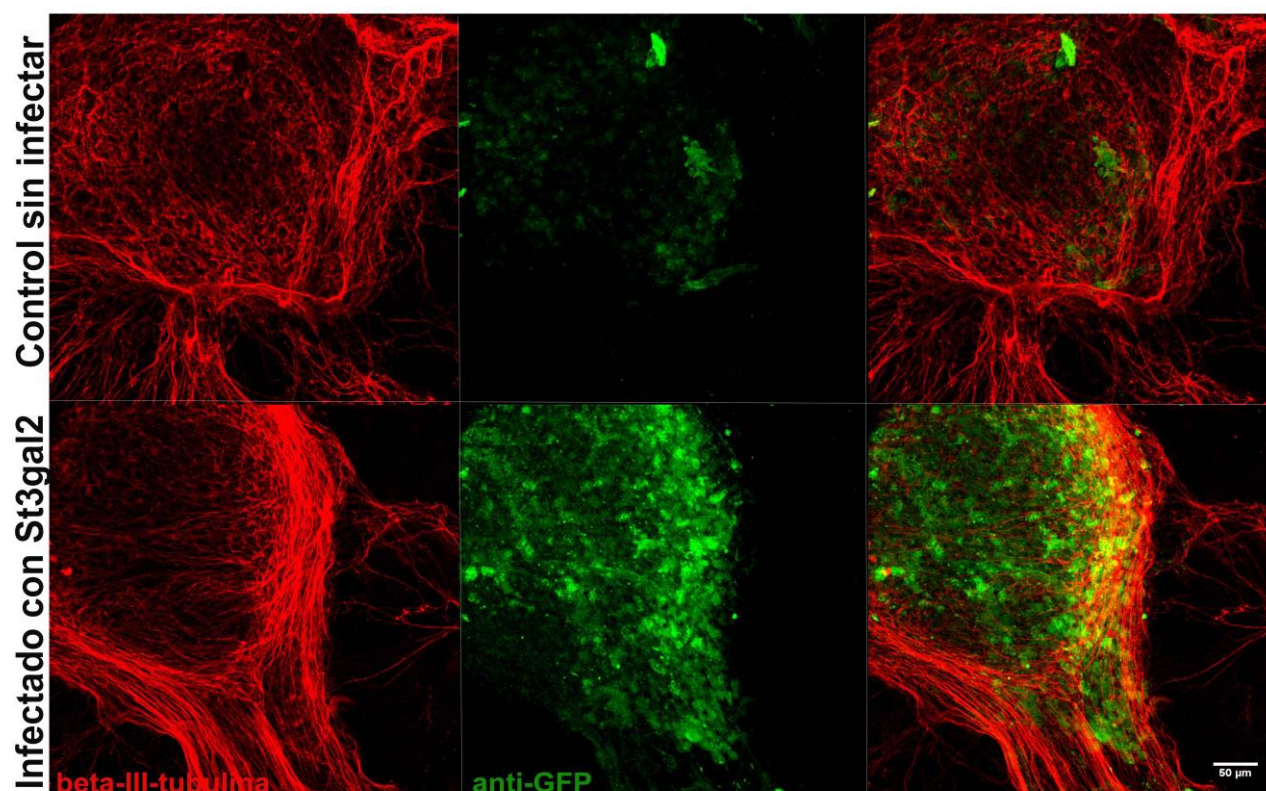


Fig.2: Los axones tratados con el anticuerpo 1B7 presentan conos de crecimiento distróficos. **A:** Microfotografías de co-cultivos de DRG-nervio tratados con IgG control o 1B7 sobre el nervio a las 24 y 48 h. Para una correcta visualización de la morfología del cono, en cada condición se muestra una imagen aumentada. **B:** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de β -III-tubulina en los conos. **C:** Cuantificación de la relación entre el diámetro del cono/diámetro del axón. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el control; n: 9 en cada grupo, T de Student. Las barras indican el ESM. Barras: 10 μ m.

A modo de validar el modelo de inhibición de la regeneración axonal producido por el anticuerpo 1B7, se generaron partículas lentivirales que contenían la secuencia shARN para St3gal2, enzima

involucrada en la vía de síntesis de los gangliósidos GD1a y GT1b blanco del anticuerpo (Sturgill et al, 2012)(ver figura 3 de los antecedentes, donde se esquematiza la ruta biosintética de los gangliósidos). Debido a la baja eficiencia de transfección que presentan los cultivos de explantos celulares, la ventaja ofrecida por esta técnica radica en la capacidad de las partículas lentivirales de infectar los mismos. Cabe destacar además, que esta partícula presenta especificidad neuronal sobre este tipo de cultivo. Las células infectadas fueron visualizadas mediante la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) como reportera, cuya secuencia se encuentra contenida en el mismo vector que la secuencia shARN (Figura 3). Los co-cultivos fueron infectados con dichas partículas virales al momento de sembrarlos y fueron tratados a las 24 y 48 h con 1 μ l de IgG control ó 1B7 (1mg/ml) sobre los nervios. A las 72h se los fijó, se les realizó una inmunomarcación para β -III-tubulina (Figura 4A) y se cuantificó el número de axones presentes en el nervio a 100 μ m desde el inicio del mismo (Figura 4B). Como resultado se encontró que los co-cultivos previamente infectados con las partículas virales, cuyo objetivo fue el silenciamiento de la expresión de St3gal2 y como consecuencia, la ausencia de los gangliósidos blanco del anticuerpo; previnieron el efecto inhibitorio del anticuerpo



1B7.

Fig.3: Las partículas lentivirales que contienen el shARN para St3gal2 infectan neuronas en los explantos de DRGs. Doble inmunomarcación para GFP (anti-GFP, verde) y para β -III-tubulina (rojo) de los explantos infectados con su posterior colocalización.

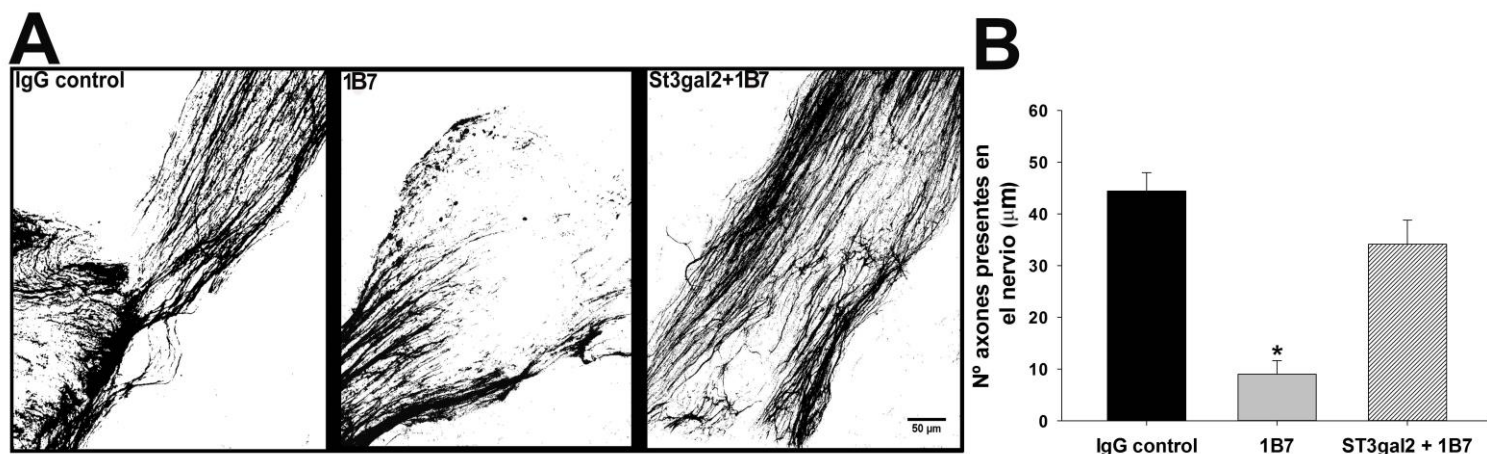


Fig.4: La infección con partículas lentivirales que contienen el shARN para St3gal2 previene el efecto inhibitorio producido por el anticuerpo 1B7 en co-cultivos de DRG-nervio. A: Microfotografías de co-cultivos de DRG-nervio tratados con IgG control o anticuerpo 1B7. Algunos cultivos tratados con 1B7 fueron previamente infectados con partículas virales y tratados con el anticuerpo 1B7. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. B: Cuantificación del número de axones presentes en el nervio. * $p < 0,05$ comparado con el control o infectado con ST3gal2, n:3 experimentos independientes. ANOVA, LSD-Fisher. Las barras indican ESM.

3.2. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 altera el citoesqueleto de conos de crecimiento de cultivos de neuronas DRGs

Si bien el modelo de co-cultivo nos permitió reproducir los conos de crecimiento distróficos encontrados en el modelo in vivo de transferencia pasiva del anticuerpo 1B7, el cuál semeja lo que ocurre en el SNC luego de una lesión, presenta una limitación a la hora de pretender realizar una caracterización y estudio con mayor grado de detalle de los efectos que produce el anticuerpo 1B7 sobre el citoesqueleto de los conos de DRGs. Por tal motivo, decidimos realizar este estudio en el modelo de cultivo dissociado de DRGs, en el cuál, los conos de crecimiento de las neuritas son considerablemente grandes a tiempos cortos post-sembradas. Para comenzar con el análisis del efecto del anticuerpo 1B7 sobre los componentes del citoesqueleto del cono de crecimiento

axonal, se tuvieron en cuenta 2 modelos o paradigmas: el crecimiento inicial de las neuritas y la extensión de las mismas, para de esta forma también averiguar si el anticuerpo 1B7 producía o no un efecto diferencial en cada uno. Para esto, cultivos de neuronas disociadas de DRGs fueron tratadas con 50 µg/ml de 1B7 o IgG control por 1h (crecimiento inicial de neuritas) y 5h (extensión de neuritas) luego de sembradas. Los cultivos fueron fijados 3 h luego del tratamiento y los componentes del citoesqueleto actina y tubulina marcados con faloidina y con el anticuerpo anti- β -III-tubulina respectivamente. (Figuras 5A y B, 6A y B). En primer lugar observamos que neuronas tratadas con el anticuerpo 1B7 mostraron agregados de F-actina en el centro del cono. Este tratamiento también alteró la marca de tubulina, donde la inmunomarcación de TUJ-1 aparece más intensa y difusa a lo largo de la zona central del cono de crecimiento (Figuras 5A y 6A). En base a las imágenes obtenidas, se cuantificó por un lado, el área correspondiente a la lamela de actina, estimada como la diferencia entre el área total ocupada por actina y el área total ocupada por tubulina y por el otro, la longitud de los filopodios (Figuras 5C y D, 6C y D). En ambos modelos o paradigmas se observó que el tratamiento con el anticuerpo 1B7 resultó en una reducción significativa del área de lamela del cono de crecimiento (el colapso completo de la misma se observó en muchas células) y reducción de la longitud de los filopodios cuando fueron comparados con los cultivos tratados con IgG control.

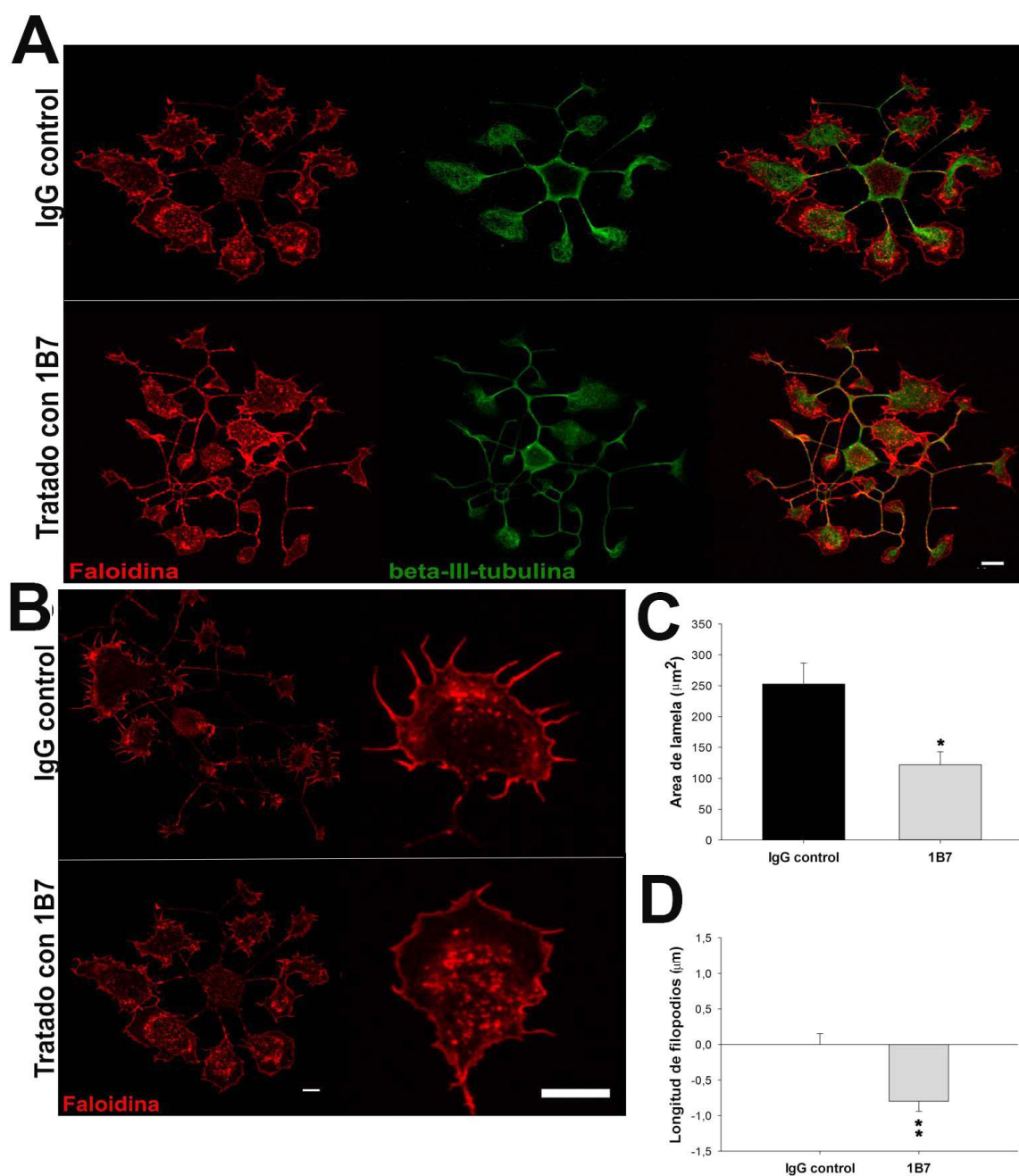


Fig.5: Cultivos disociados de DRGs tratados con el anticuerpo 1B7 presentan alteraciones de citoesqueleto de actina en los conos de crecimiento en el paradigma de crecimiento inicial de neuritas. A: Microfotografías de conos de DRGs tratados con IgG control o el anticuerpo 1B7 e inmunomarcados con TUJ-1 (verde) y faloidina (rojo). **B:** Microfotografías de conos de DRGs tratados con IgG control o el anticuerpo 1B7 e inmunomarcadas con faloidina. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **CyD:** Cuantificación del área de lamela y longitud de filopodios en los conos de crecimiento de DRGs. ** $p < 0,01$ comparado con el control, $n: 60$ conos en cada condición, T de Student. Las barras indican ESM. Barras: $20\mu\text{m}$.

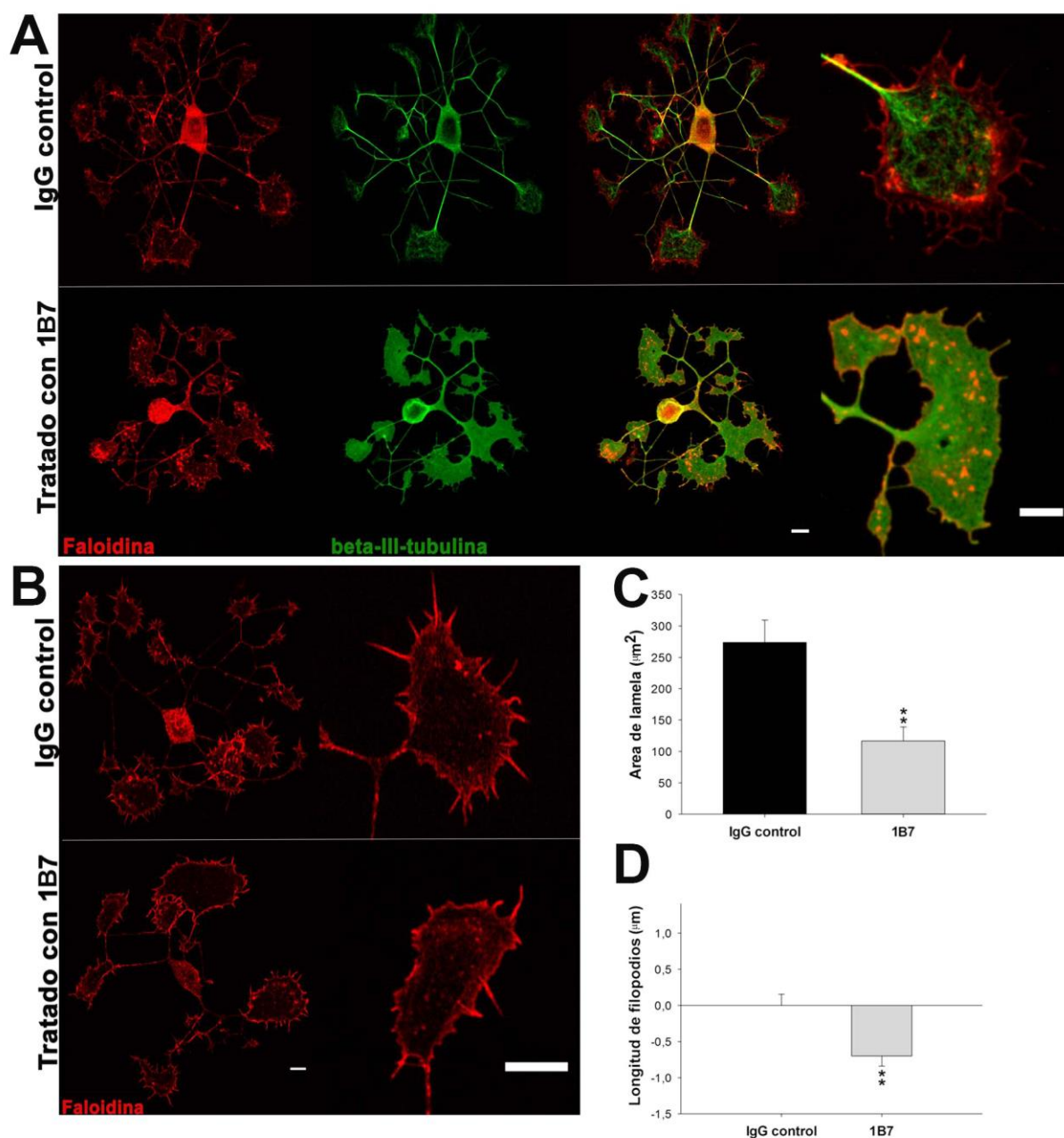


Fig.6: Cultivos disociados de DRGs tratados con el anticuerpo 1B7 presentan alteraciones de citoesqueleto de actina en los conos de crecimiento en el paradigma de extensión de neuritas. A: Microfotografías de conos de DRGs tratados con IgG control o el anticuerpo 1B7 e inmunomarcados con TUJ-1 (verde) y faloidina (rojo). **B:** Microfotografías de conos de DRGs tratados con IgG control o el anticuerpo 1B7 e inmunomarcadas con faloidina. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **CyD:** Cuantificación del área de lamela y longitud de filopodios en los conos de crecimiento de DRGs. ** $p < 0,01$ comparado con el control, $n: 63$ conos en cada condición, T de Student. Las barras indican ESM. Barras: $20\mu\text{m}$.

Por otra parte, para el análisis de la dinámica de los microtúbulos en conos de crecimiento se llevó a cabo la inmunomarcación de los cultivos con anticuerpos anti-tubulina acetilada y tirosinada (Figuras 7A). Para esto, se cuantificó la relación entre microtúbulos acetilados (estables)/tirosinados (dinámicos) (Figuras 7B y 8B). Nuevamente, en ambos paradigmas, los cultivos tratados con el anticuerpo 1B7 mostraron un incremento de la relación asociado con una disminución significativa del área de tubulina tirosinada (Figura 8C). A raíz de haber obtenido el mismo resultado en función del efecto del anticuerpo 1B7 en ambos procesos, se decidió continuar con el estudio de los mecanismos moleculares y vías de señalización activadas por el anticuerpo 1B7 en el paradigma de extensión de neuritas, es decir, 5h luego de sembradas las neuronas.

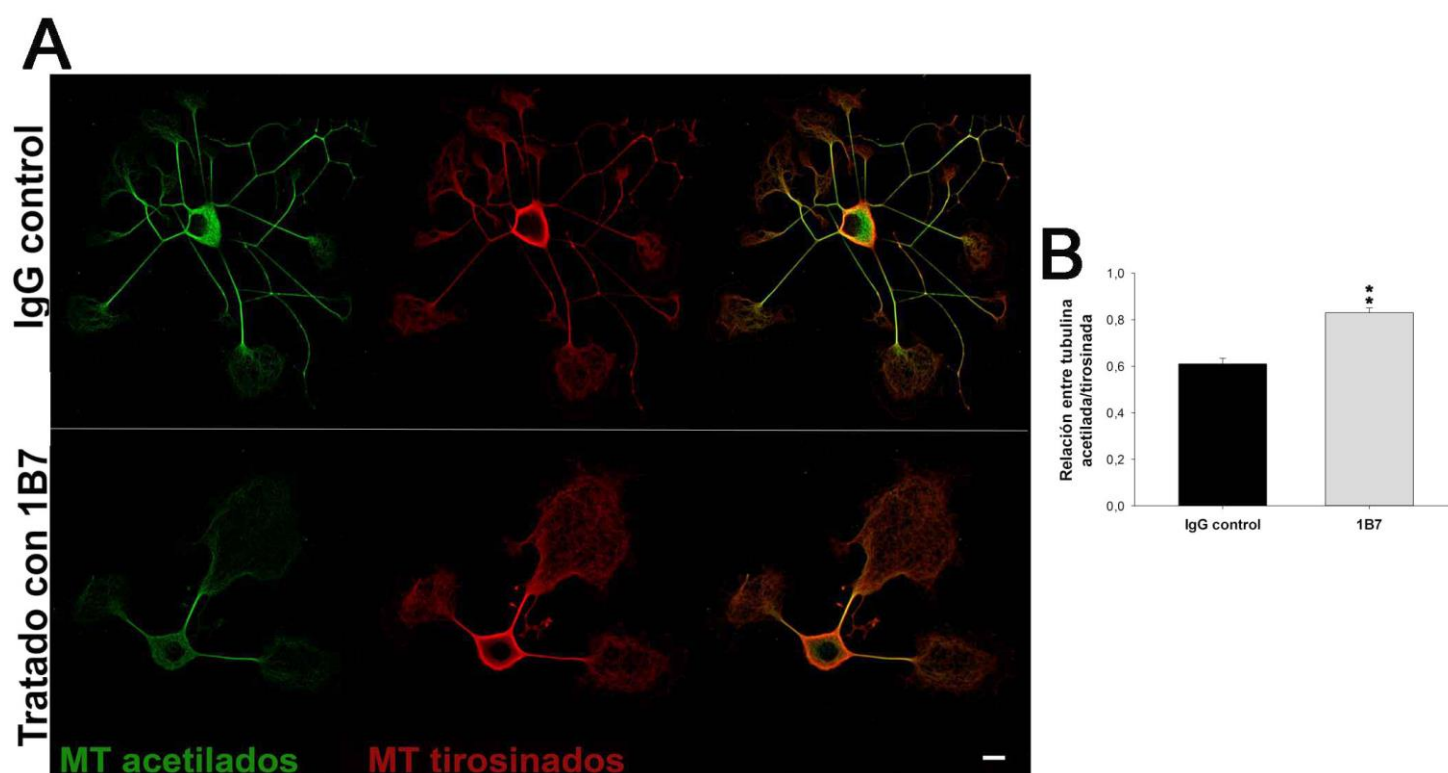


Fig.7: Cultivos disociados de DRGs tratados con el anticuerpo 1B7 presentan alteraciones de citoesqueleto de tubulina en los conos de crecimiento en el paradigma de crecimiento inicial de neuritas. A: Microfotografías de conos de DRGs tratados con IgG control o el anticuerpo 1B7 e inmunomarcados con anticuerpos contra tubulina acetilada (verde) y tirosinada (rojo). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **B:** Cuantificación de la relación entre el área ocupada por tubulina acetilada y el área ocupada por tubulina tirosinada en conos de DRGs.** $p < 0,01$ comparado con el control, $n: 75$ conos. Las barras indican ESM. Barras: $20\mu\text{m}$.

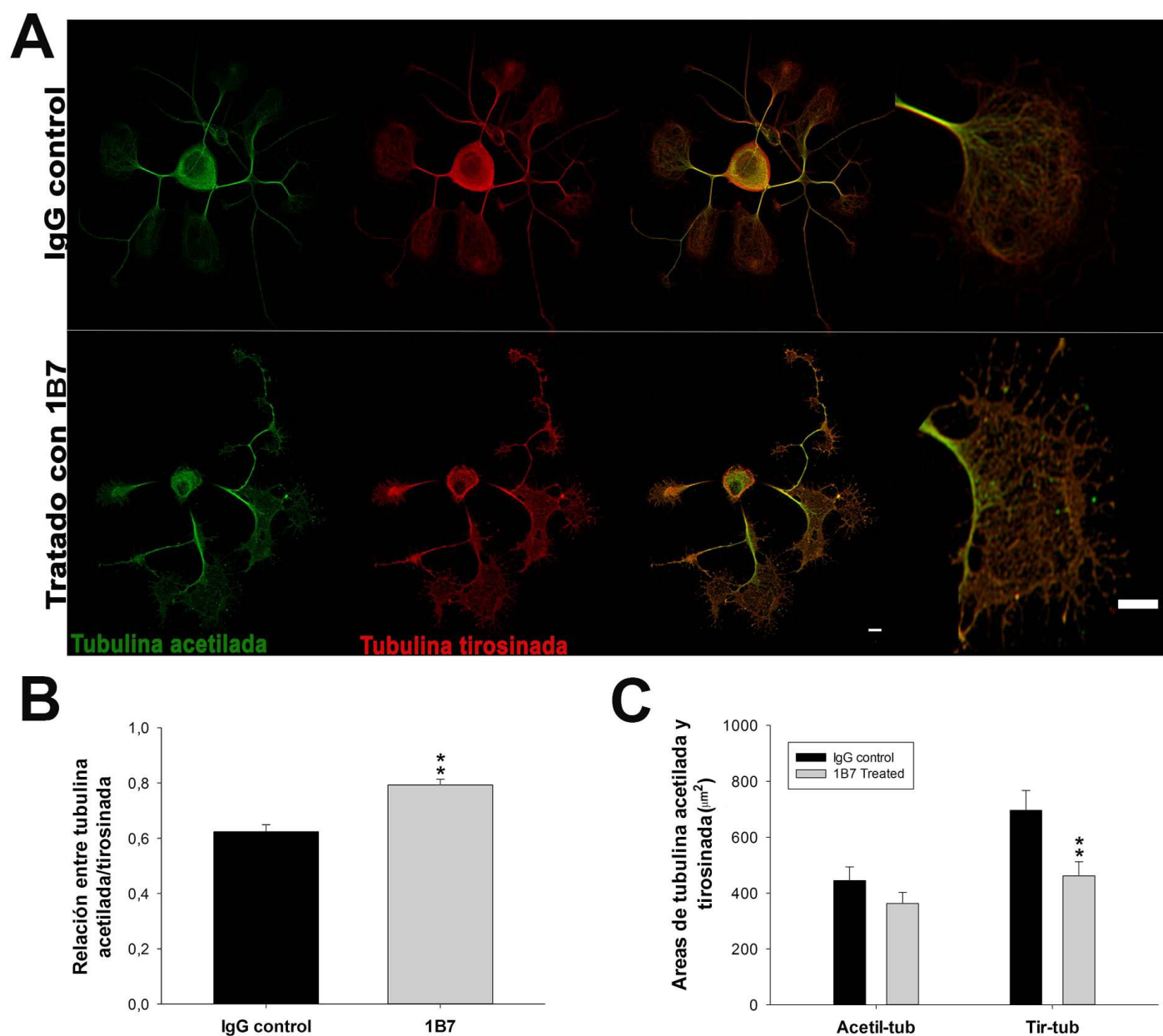


Fig.8: Cultivos disociados de DRGs tratados con el anticuerpo 1B7 presentan alteraciones de citoesqueleto de tubulina en los conos de crecimiento en el paradigma de extensión de neuritas. A: Microfotografías de conos de DRGs tratados con IgG control o el anticuerpo 1B7 e inmunomarcados con anticuerpos contra tubulina acetilada (verde) y tirosinada (rojo). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **B:** Cuantificación de la relación entre el área ocupada por tubulina acetilada y el área ocupada por tubulina tirosinada en conos de DRGs. **C:** Cuantificación de las áreas de tubulina acetilada y tubulina tirosinada entre la condición tratada con el anticuerpo 1B7 y la control. ** $p < 0,01$ comparado con el control, $n = 84$ conos en cada condición, T de Student. Las barras indican ESM. Barras: 20 μm .

3.3. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 altera el citoesqueleto de los conos de crecimiento de neuronas DRGs de manera disociada temporalmente.

Posteriormente nos propusimos analizar temporalmente el efecto producido por el anticuerpo 1B7 en el citoesqueleto de DRGs mediante video microscopía. Para esto, DRGs fueron nucleoinfectadas con α -tubulina fusionada a la proteína verde fluorescente (tubulina-GFP) y Lifeact-mCherry (actina) y tanto la morfología del cono de crecimiento como la organización del citoesqueleto se evaluaron en tiempo real. Los controles incluyeron el tratamiento con IgG ó un pre-tratamiento de 1 h con 10mU/ml de V. Colera Sialidasa que hidroliza residuos de ácido siálicos incluyendo los presentes en las moléculas de GD1a/GT1b, eliminando así la unión del gangliósido al anticuerpo 1B7. El tratamiento con 1B7 (50 μ g/ml) indujo un progresivo y rápido colapso de la lamela de actina notable a los 30 min, llegando al nivel máximo a los 60 min (Figura 9B); mientras que la reducción significativa de la longitud de filopodios se observó a los 60 min (Figura 9E). En cuanto al efecto del tratamiento con 1B7 en el citoesqueleto de tubulina, también se detectó a los 60 min, el cual se caracterizó por una retracción progresiva del área de tubulina-GFP (Figura 9C) y una disminución en la extensión de neuritas (Figura 9D). En conclusión, el tratamiento con el anticuerpo 1B7 resultó llamativamente en una disociación temporal de las alteraciones morfológicas en los conos de crecimiento de las neuronas DRGs; mostrando una rápida pérdida de lamela dentro de los primeros 30 min y luego un efecto tardío significativo sobre la tubulina y los filopodios de actina.

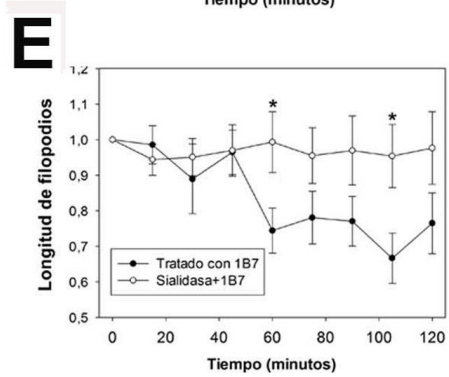
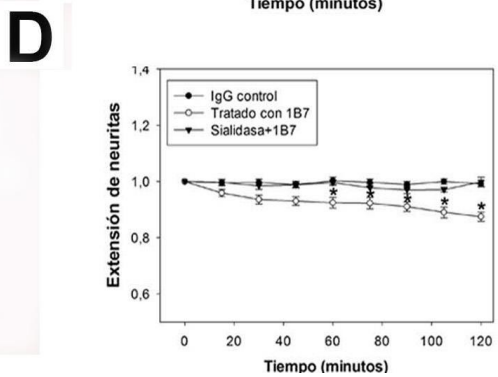
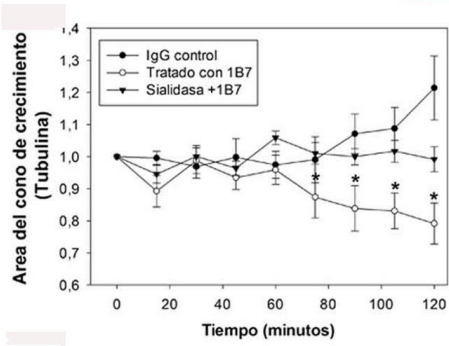
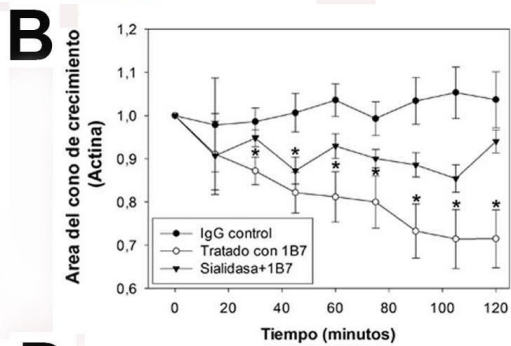
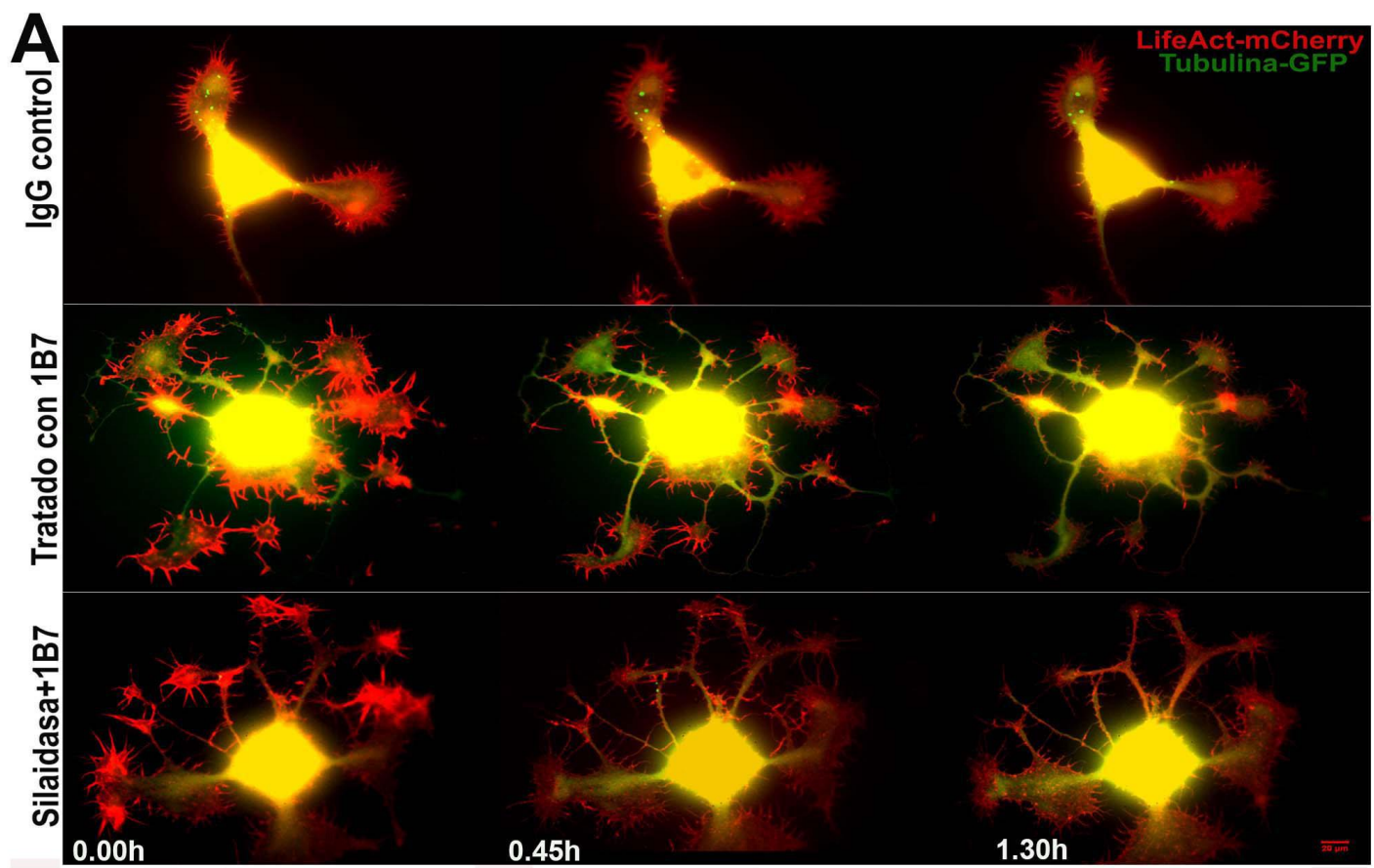


Fig.9: El estudio curso temporal del anticuerpo 1B7 muestra un efecto disociado en el tiempo en las alteraciones del citoesqueleto de actina y tubulina en neuronas disociadas de DRGs. Neuronas DRGs fueron nucleoinfectadas con Lifeact-mCherry (rojo) y tubulina-GFP (verde) y tratadas 5 horas post-nucleoinfección. Imágenes de los cultivos fueron obtenidas cada 15 min durante 90 min en un microscopio DSU (disco giratorio, por sus siglas en inglés). **A:** Microfotografías de neuronas de DRGs tratadas con el anticuerpo 1B7 y las condiciones controles de IgG y Sialidasa con 1B7. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **B:** Cuantificación del área del cono de crecimiento de actina. **C:** Cuantificación del área del cono de crecimiento de tubulina. **D:** Cuantificación de la extensión de neuritas. **E:** Cuantificación de la longitud de filopodios. Todas las imágenes fueron normalizadas con respecto al tiempo 0 min.* $p < 0,05$ comparado con las condiciones controles ANOVA-LSD Fisher, n: 3 experimentos independientes. Las barras indican ESM.

4. ESTUDIO DE LOS EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR GENERADOS POR EL ANTICUERPO ANTI-GANGLIÓSIDOS 1B7.

4.1. El anticuerpo 1B7 induce activación tardía de la pequeña GTPasa RhoA.

Ha sido reportado previamente que el anticuerpo 1B7 inhibe la extensión del crecimiento neurítico de neuronas DRGs mediante la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK (Zhang et al, 2011). En el citado trabajo, la actividad de RhoA fue medida a través de la técnica de SDS-Western Blot y pull down utilizando homogenato total de neuronas DRGs, lo cual no permite un análisis espacial de la misma. En el presente trabajo, se propuso realizar dicha medición mediante la técnica de Transferencia de Energía Resonante Fluorescente (FRET por sus siglas en inglés). Para ello, neuronas DRGs fueron electroporadas con un biosensor de RhoA basado en FRET y cultivadas por 24 h para permitir la apropiada expresión del mismo. Luego las células fueron mecánicamente disociadas y re-sembradas por 5 h para permitir la extensión de neuritas. La actividad de RhoA se cuantificó en conos de crecimiento de neuronas DRGs tratadas con el anticuerpo 1B7 (50 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de tratamiento (0, 15, 30, 45, 60 y 90 min) (Figura 10), encontrando un pico de activación de la misma a los 30 min post-tratamiento. Llamativamente, esta activación precede las alteraciones producidas por el anticuerpo sobre los filopodios y la dinámica de MTs pero no el colapso de lamela.

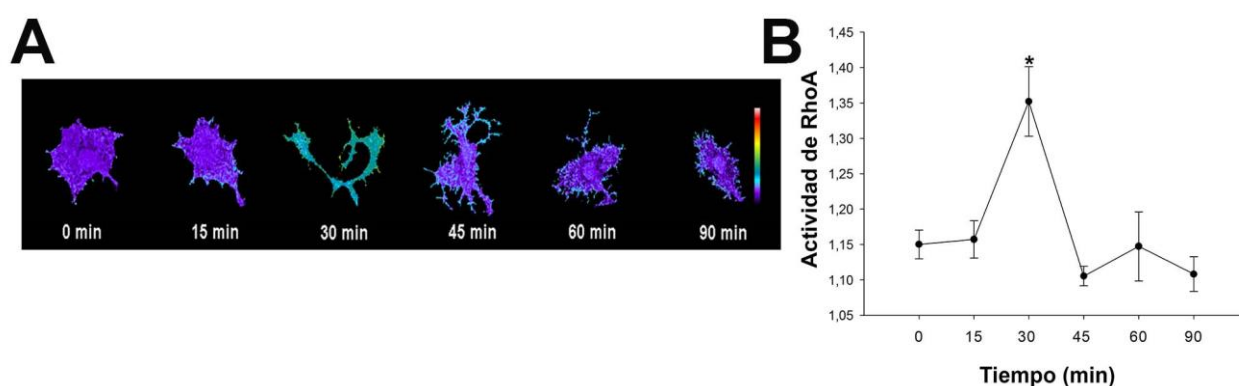
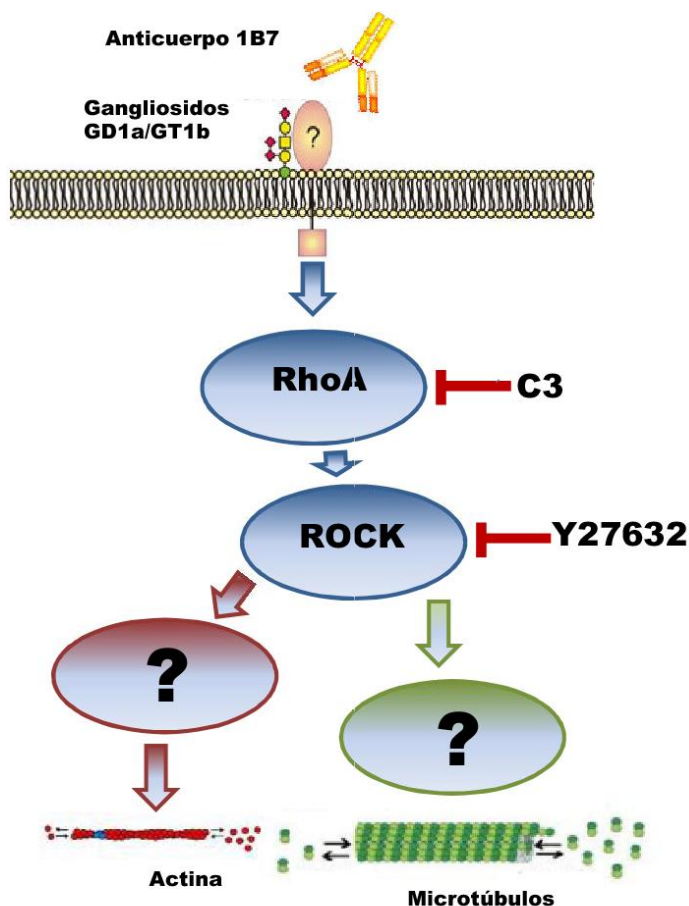


Fig.10: El tratamiento de neuronas disociadas de DRGs con el anticuerpo 1B7 induce activación de RhoA en conos de crecimiento de DRGs. Neuronas DRGs fueron electroporadas con un biosensor de RhoA basado en FRET 5 h antes de tratarlas con 50 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo 1B7. **A:** Microfotografías tomadas a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 90 min) luego del tratamiento con el anticuerpo 1B7 son ilustradas en un mapa termal de pseudo-color que muestra la activación de RhoA en conos de DRGs (colores fuertes, alta actividad de FRET; colores fríos, bajo FRET). **B:** Cuantificación de la actividad de RhoA. * $p < 0,05$ ANOVA-LSD Fisher, $n:4$ experimentos independientes. Las barras indican ESM.

4.2. El tratamiento con inhibidores de la vía de señalización de RhoA/ROCK es capaz de prevenir efectos sobre tubulina y filopodios pero no los efectos sobre el colapso de la lamela.

A partir de la observación de que las alteraciones morfológicas que produce el anticuerpo 1B7 muestran una disociación temporal, y que la activación de RhoA sólo precede los efectos sobre filopodios y tubulina, se hipotetizó que eso podía implicar la activación de diferentes vías de señalización. Para responder esto, se analizó el efecto de dos inhibidores farmacológicos específicos de la vía de señalización de RhoA/ROCK (Esquema 1). Por un lado, se utilizó una versión permeable para las células de la exoenzima C3 transferasa, TAT-C3, inhibidor de las Rho GTPasas y por otro, Y-27632, un inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK). El tratamiento de las neuronas de DRGs con 1 $\mu\text{g/ml}$ de TAT-C3 1h antes de la adición del anticuerpo 1B7 demostró no ser efectivo para prevenir la reducción del área de la lamela (Figura 11A y 12A). Sin embargo, si lo fue en la prevención del acortamiento de los filopodios (de hecho, incrementó la longitud de los

mismos) (Figura 12 B) y la pérdida de MTs dinámicos en los conos de crecimiento, preservando la relación entre MTs acetilados/tirosinados (Figura 13 A). Resultados similares se observaron cuando se trataron las neuronas con 2 concentraciones diferentes (2 y 10 μM) de Y-27632. Cabe resaltar que se utilizaron 2 concentraciones porque si bien la concentración 10 μM del inhibidor es ampliamente utilizado en la bibliografía, es sabido que a esta concentración Y-27632 tiene efectos per se sobre el citoesqueleto, esto es, aumentar la extensión de neuritas y disminuir el número de filopodios pero haciendo que estos sean de mayor longitud (Alabed et al, 2006; Darenfed et al, 2007). Por tal motivo, decidimos probar una concentración del inhibidor 5 veces menor a la convencionalmente utilizada para estar seguros de observar los mismos efectos (Figura 11). El pre-tratamiento con Y-27632 no fue capaz de bloquear el colapso de lamela inducido por el anticuerpo 1B7 (Figura 12A) mientras que si preservó la dinámica de MTs en los conos de crecimiento (similar relación de MTs acetilados/tirosinados a los tratados con IgG control, Figura 13A) y la longitud de los filopodios (Figura 12B). Estos resultados sugirieron que el anticuerpo 1B7 induce alteraciones morfológicas en los conos de crecimiento mediante la activación de vías tanto dependiente como independiente de la vía de señalización RhoA/ROCK.



Esquema 1: Representación de la vía activada por el anticuerpo 1B7 y los inhibidores farmacológicos utilizados en el presente trabajo.

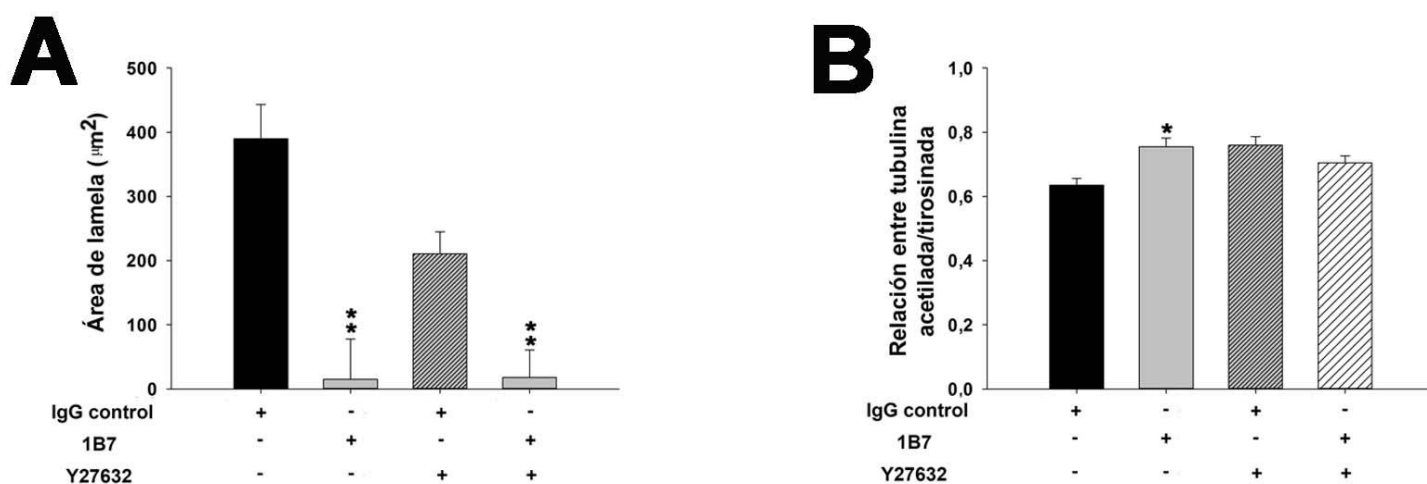


Figura 11: El tratamiento con el inhibidor de ROCK revierte el efecto del anticuerpo 1B7 sobre la dinámica de microtúbulos pero no sobre el colapso de la lamela de actina. Cultivos de DRGs fueron tratadas con 2 μM de Y-27632 por 2 h a las 3 h de sembradas y luego tratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de IgG control o el anticuerpo 1B7 por 1,5 h adicional. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **A y B:** Cuantificación del área de lamela y la relación entre microtúbulos acetilados/tirosinados en los conos de crecimiento en cada condición experimental. ** $p < 0,01$ comparado con las condiciones controles, ANOVA-LSD Fisher, $n:3$ experimentos independientes. Las barras indican ESM.

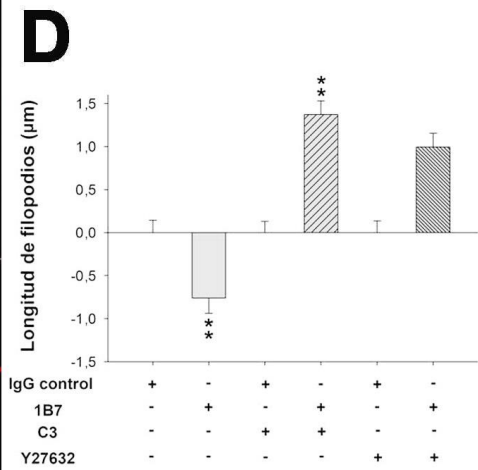
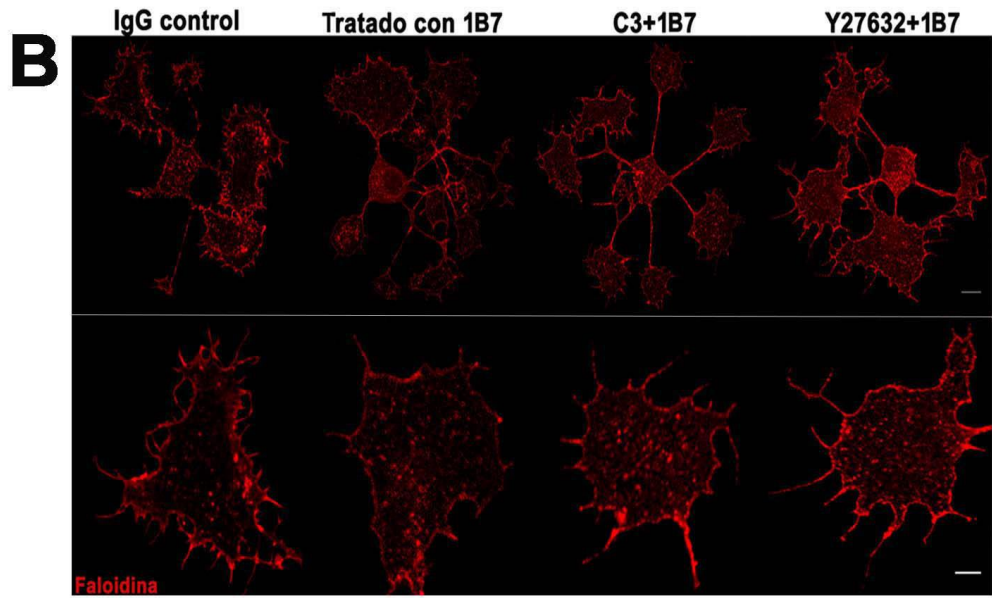
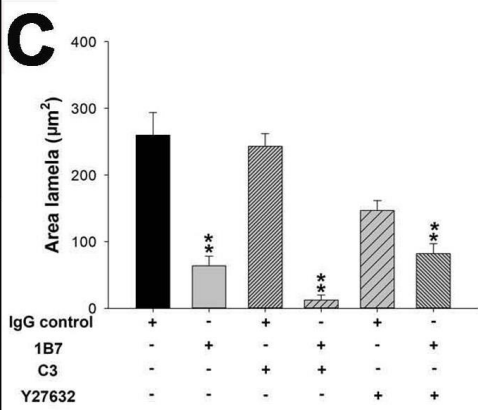
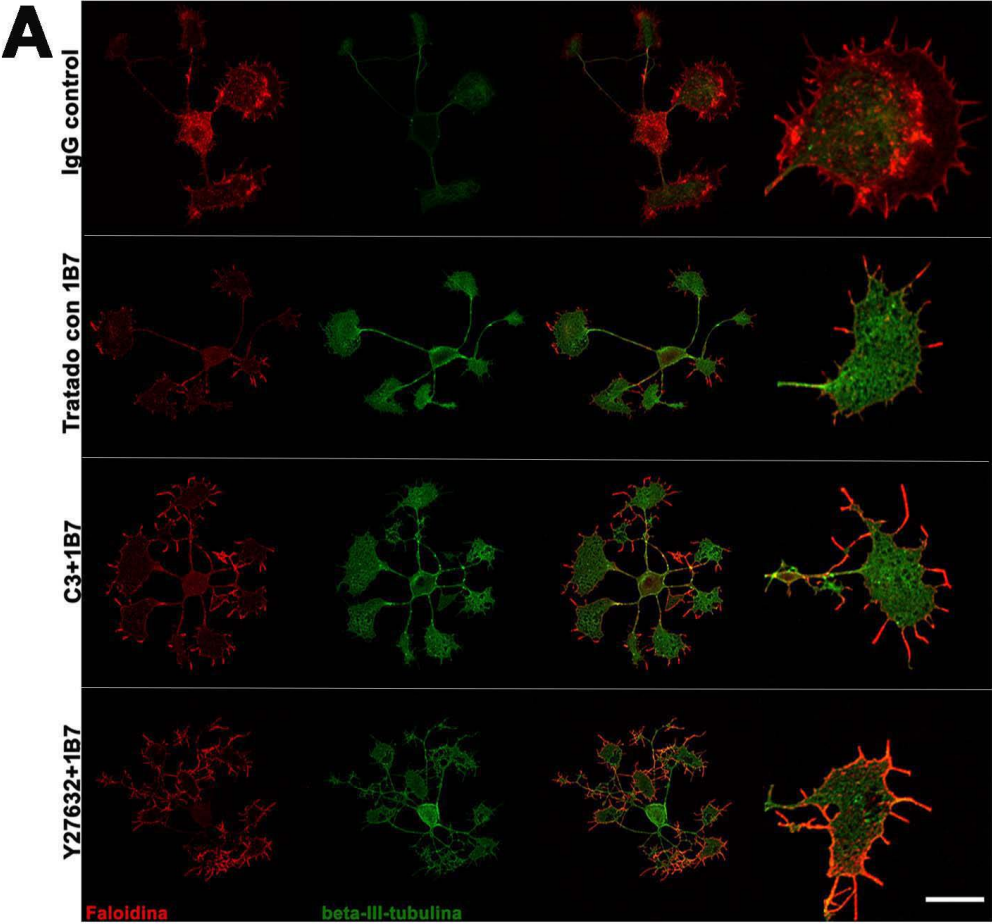


Figura 12: El tratamiento con inhibidores de la vía de RhoA/ROCK revierte el efecto del anticuerpo 1B7 sobre la retracción de filopodios pero no sobre el colapso de la lamela. Cultivos de DRGs fueron tratados 4 horas luego de sembradas con 1 μ g/ml de C3 tranferasa por 1 h ó 2 h con 10 μ M de Y-27632 y luego tratadas con 50 μ g/ml de IgG control o el anticuerpo 1B7 por 1,5 h adicional. **A:** Microfotografías de conos de DRGs en cada condición experimental inmunomarcados con TUJ-1 y faloidina. **B:** Microfotografías de conos de DRGs en cada condición experimental inmunomarcados con faloidina. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **CyD:** Cuantificación del área de lamela y longitud de filopodios en los conos de crecimiento de DRGs en las diferentes condiciones. ** $p < 0,01$ comparado con las condiciones controles, ANOVA-LSD Fisher, n:3 experimentos independientes. Las barras indican ESM. Barras: 20 μ m.

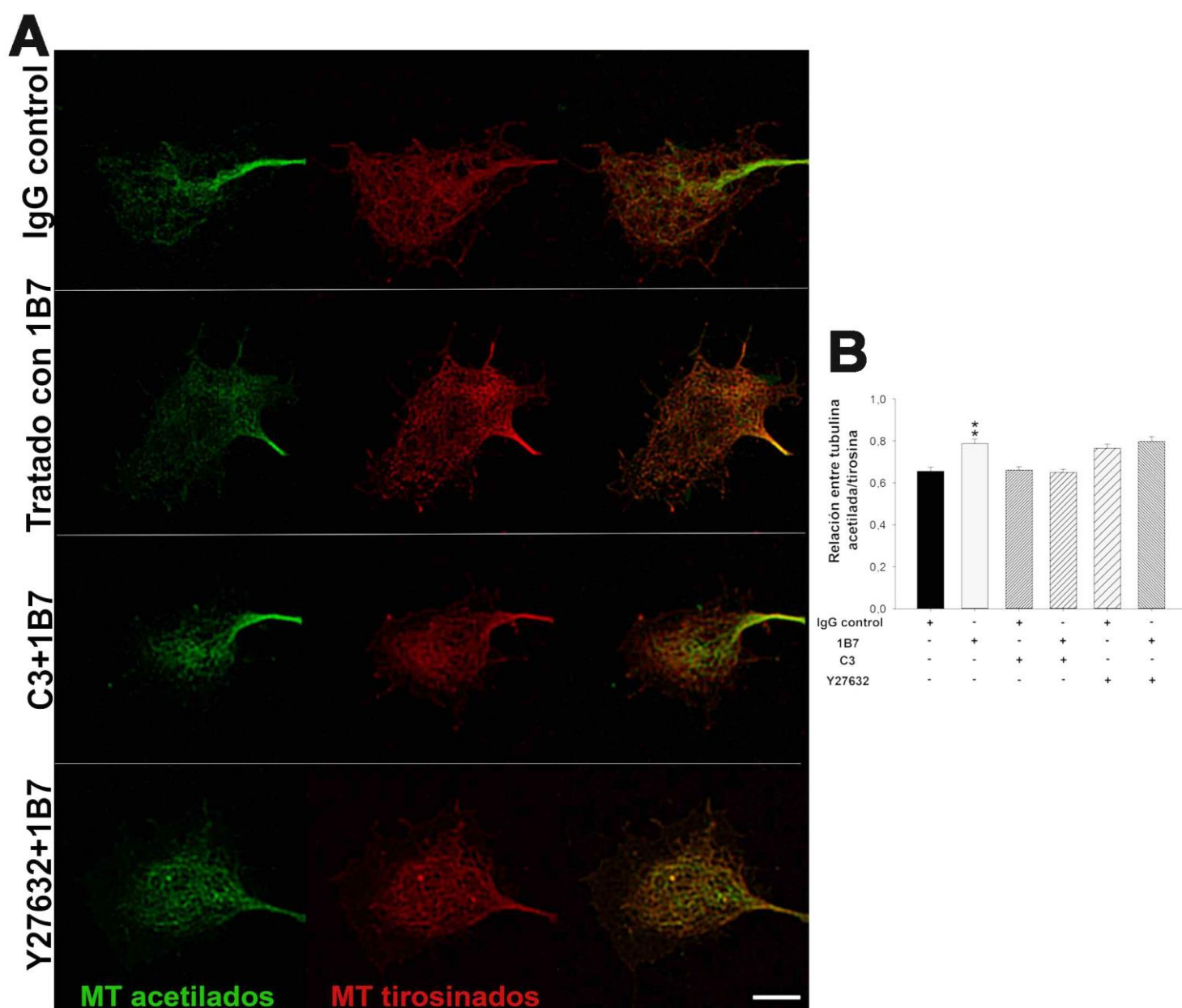


Figura 13: El tratamiento con inhibidores de la vía de señalización RhoA/ROCK revierte el efecto del anticuerpo 1B7 sobre la dinámica de microtúbulos. Cultivos de DRGs fueron tratados 4 h luego de sembradas con 1 μ g/ml de C3 tranferasa por 1 h ó 2 h con 10 μ M de Y-27632 y luego tratadas con 50 μ g/ml de IgG control o el anticuerpo 1B7 por 1,5 h adicional. **A:** Microfotografías de conos de DRGs en cada condición experimental inmunomarcados para la visualización de los microtúbulos acetilados (verde) y tirosinados (rojo). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **B:** Cuantificación de la relación entre el área ocupada por microtúbulos acetilados/área ocupada por microtúbulos tirosinados en los conos de crecimiento de DRGs en las diferentes condiciones. ** $p < 0,01$ comparado con las condiciones controles, ANOVA-LSD Fisher, n:3 experimentos independientes. Las barras indican ESM. Barras: 20 μ m.

4.3. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 induce aumento de la fosforilación de la Proteína Mediadora del Colapso-2 en el sitio Treonina 555 dependiente de la actividad de ROCK.

A continuación estudiamos la/s molécula/s aguas abajo en la vía de señalización RhoA/ROCK involucrada en el efecto del anticuerpo 1B7 sobre el citoesqueleto en los conos de crecimiento. Previamente ha sido descubierto que la Glicoproteína Asociada a Mielina (MAG), uno de los inhibidores de la regeneración axonal derivada de mielina más potente, inhibe el crecimiento neurítico de neuronas cerebelares granulares mediante la activación de la vía RhoA/ROCK y su efectora aguas abajo, la proteína Mediadora de la Respuesta del Colapso 2 (CRMP-2) (Mimura et al, 2006). Como la acción inhibitoria de MAG en estas células se basa en la unión a los gangliósidos GD1a y/o GT1b, hipotetizamos que el anticuerpo 1B7 podía alterar la organización de los conos de crecimiento e inhibir la longitud neurítica por mecanismos de señalización similares (Mehta et al, 2007; Venkatesh et al, 2007). Primero estudiamos por inmunomarcación si el anticuerpo 1B7 inducía la fosforilación/inactivación de CRMP-2 en el sitio de fosforilación dependiente de ROCK, Treonina 555. Para esto, a cultivos de neuronas DRGs tratadas con el anticuerpo 1B7 se le realizó inmunofluorescencia con anticuerpos anti-CRMP-2 total (tCRMP-2) y anti-CRMP-2 T555 (Figura 14A) y se cuantificó la relación entre la intensidad de fluorescencia dada por la marca de CRMP-2 T555/CRMP-2 total (Figura 14B). Como resultado, DRGs tratadas por 30 y 60 min con 50 μ g/ml 1B7 mostraron un aumento en la fosforilación de CRMP-2 T555 a lo largo de los axones en comparación con los cultivos tratados con IgG control. Estos resultados fueron luego confirmados mediante electroforesis de proteínas (Western Blot-SDS Page) en homogenatos de una línea celular estable de células de ovario de hámster (CHO) que presentan un alta expresión del gangliósido GD1a (CHO-

K1GD1a+) las cuales fueron transfectadas con el vector que contiene la secuencia para CRMP-2 wt (salvaje, según las siglas en inglés).

El tratamiento de las células con 50 µg/ml del anticuerpo 1B7 indujo un incremento significativo de la fosforilación de CRMP-2 T555 a los 30 min pero no a los 60 min luego del tratamiento (Figura 14C).

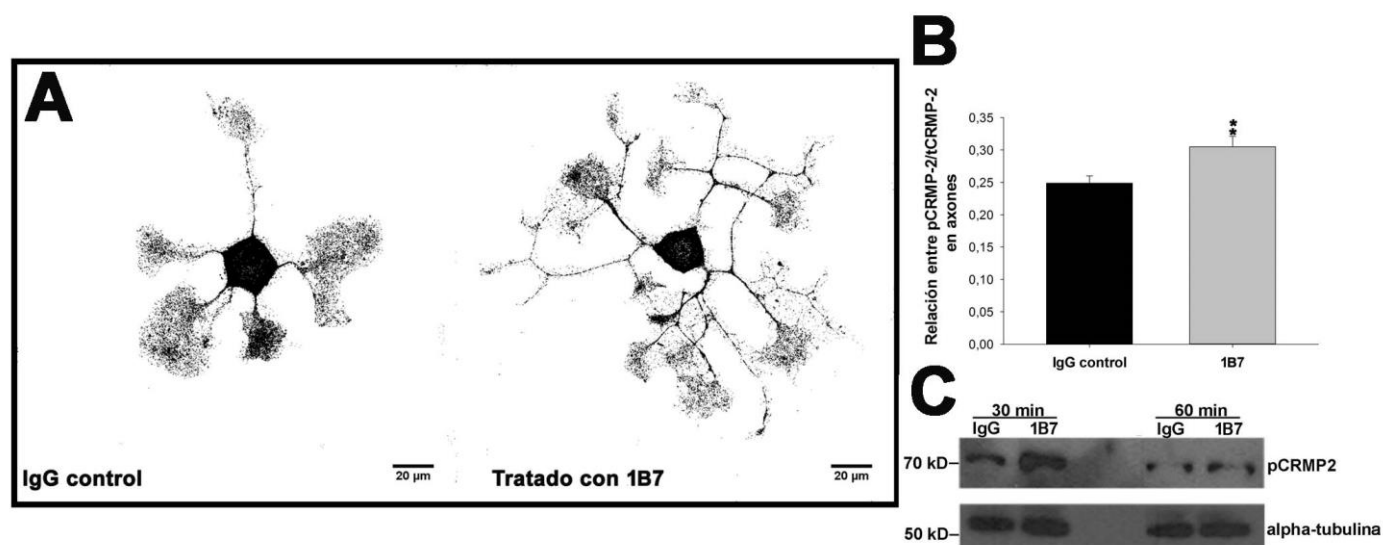
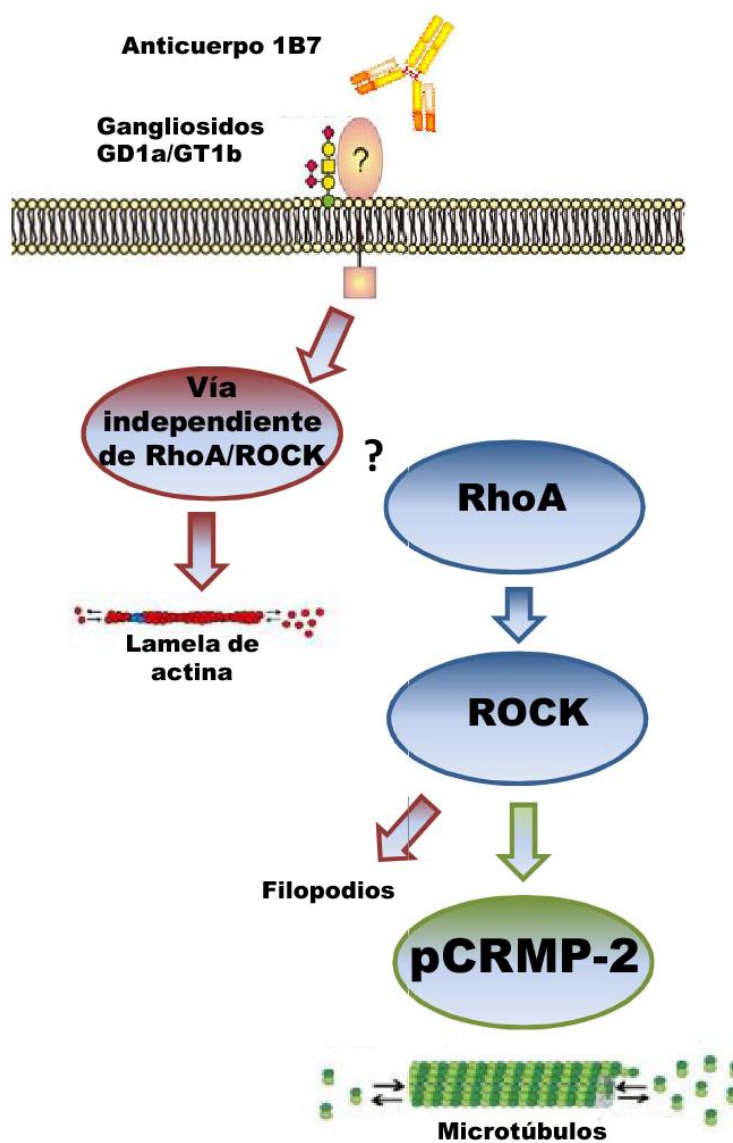


Figura 14: El anticuerpo 1B7 induce la fosforilación/inactivación de la proteína CRMP-2. **A:** Cultivo de neuronas DRGs fueron tratadas durante 30 min a las 5 h luego de sembradas con 50 µg/ml de IgG control o el anticuerpo 1B7 y luego inmunomarcadas con anticuerpos anti-pCRMP-2 T555 y tCRMP-2. Micrografías de cada condición son visualizadas en la escala de grises para aumentar la claridad. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **B:** Cuantificación de la relación entre la intensidad de fluorescencia de pCRMP2/tCRMP2 en axones a los 30 min. **C:** Células CHO-K1GD1a+ fueron transfectadas con CRMP2 wt y tratadas con 50 µg/ml del anticuerpo 1B7 ó IgG control a 30 y 60 min. Las células fueron lisadas y examinadas por Western blot. ** $p < 0,01$ comparado con el control, T de Student, n: 70 conos en cada condición. Las barras indican ESM.

4.4. El tratamiento con el anticuerpo 1B7 inhibe la extensión de neuritas a través de la fosforilación/inactivación de CRMP-2 en la T555 en forma dependiente de la actividad de ROCK.

Con el propósito de confirmar el rol de CRMP-2 como efector aguas debajo de la vía dependiente de RhoA/ROCK activada por el anticuerpo 1B7 en la extensión de neuritas, neuronas DRGs fueron electroporadas con vectores que contenían las secuencias de CRMP-2 salvaje y CRMP-2 mutante, T555A (en la cual la treonina 555 fue remplazada por un residuo no-fosforilable, alanina, generándole a la proteína resistencia a la acción regulatoria de ROCK). Cabe destacar que los constructos estaban fusionados a la proteína FLAG, la cual se utilizó para visualizar las neuronas positivamente electroporadas. Las neuronas DRGs fueron tratadas con el anticuerpo 1B7 ó IgG control (50 µg/ml) 1h luego de sembradas y mantenidas en cultivo durante 23 h luego de tratarlas. Luego fueron fijadas e inmunomarcadas con anticuerpo anti-FLAG (Figura 15C). De las imágenes obtenidas de cada neurona, se cuantificó la extensión de la neurita más larga como medida del crecimiento neurítico. Como resultado, se pudo observar que las neuronas DRGs transfectadas con CRMP-2 salvaje y tratadas con el anticuerpo 1B7 mostraron una inhibición del 36% en la extensión de neuritas con respecto a los cultivos tratados con IgG control (Figura 15D). Por el contrario, la acción inhibitoria del anticuerpo 1B7 en la extensión neurítica fue significativamente prevenida en las neuronas DRGs que sobreexpresaban la mutante CRMP-2 T555A (sólo 17% de diferencia comparado con los cultivos controles; $p \geq 0.05$; Figura 15D). Como control adicional, para conocer el porcentaje de inhibición que producía el anticuerpo 1B7 sobre la extensión de neuritas y descartar a su vez algún efecto per se que pudiera estar produciendo la sobreexpresión de la proteína CRMP-2; se electroporaron neuronas DRGs con un vector comercial (pMAX que está fusionado a proteína verde fluorescente, utilizada como reportera) y se trataron las neuronas con el anticuerpo 1B7 ó IgG control (50 µg/ml) 1h luego de sembradas y cultivadas por 23 h luego de tratarlas (Figura 15A). Luego fueron fijadas y cuantificadas de acuerdo a lo descripto anteriormente. Como resultado, se encontró que el anticuerpo 1B7 produjo un 25% de inhibición en los cultivos tratados en comparación de los controles (Figura 15B). En conjunto, estos datos identificaron a la proteína CRMP-2 como una molécula aguas debajo de la cascada de señalización RhoA/ROCK mediadora de la actividad inhibitoria del crecimiento neurítico del anticuerpo 1B7 (Esquema 2).



Esquema 2: Representación en función de los resultados obtenidos de la vía de señalización dependiente e independiente de RhoA/ROCK activada por el anticuerpo 1B7 y su efecto sobre los componentes del citoesqueleto.

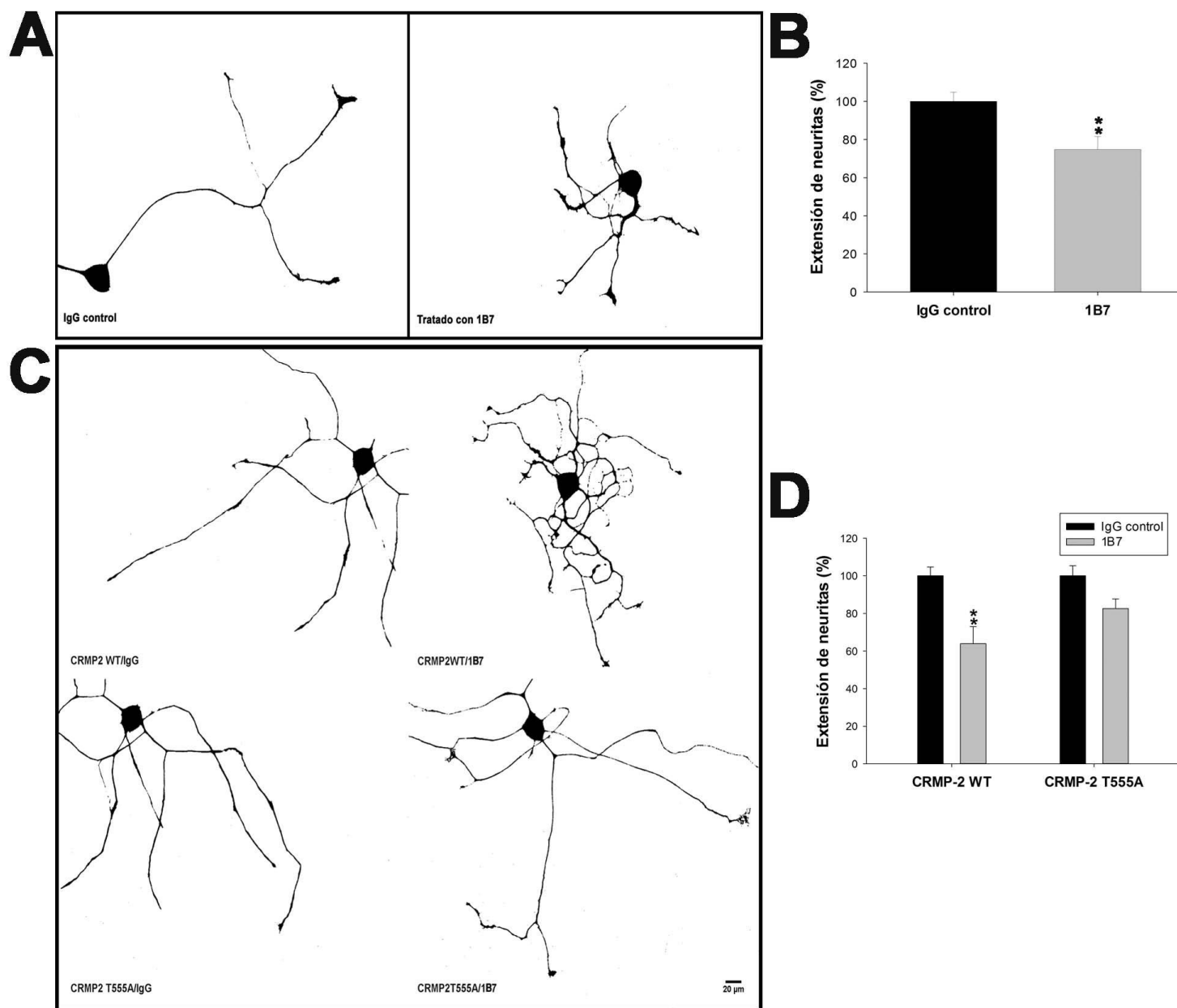


Figura 15: La forma mutante de CRMP-2 en el sitio de fosforilación dependiente de ROCK (CRMP2 T555A) revierte la inhibición en el crecimiento neurítico producido por el anticuerpo 1B7. Cultivos de neuronas DRGs fueron electroporados y tratadas 1 h luego de sembradas con 50 μ g/ml de IgG control ó 1B7 por 24 h. **A:** DRGs electroporadas con el vector pMAX-GFP. **B:** DRGs electroporadas con la forma wt de CRMP-2 o la forma mutante CRMP-2 T555A. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. **C y D:** Cuantificación del crecimiento neurítico expresado en %. ** $p < 0,01$ comparado con el control, n: 273 conos, T de Student. Las barras indican ESM.

5. MODULACION DE LA INHIBICION DE LA REGENERACION AXONAL INDUCIDA POR EL ANTICUERPO ANTI-GANGLIÓSIDOS 1B7 EN MODELO IN VIVO.

5.1. Electroporación in vivo de DRG con la forma mutante de CRMP-2 en el sitio de fosforilación dependiente de ROCK (CRMP-2 T555A) sobrepasa el efecto inhibitorio del anticuerpo 1B7 en un modelo animal de regeneración axonal.

Dado que el acúmulo de CRMP-2 en nervios regenerando y su sobreexpresión aumentan la regeneración axonal en nervios lesionados en neuronas motoras (Suzuki et al, 2003), nos propusimos confirmar su rol como un mediador aguas abajo en la vía de señalización RhoA/ROCK del efecto inhibitorio del anticuerpo 1B7 sobre la regeneración axonal en un modelo animal establecido. Mediante cirugía de hemilaminectomía para acceder a las DRGs L4-L5, los constructos de CRMP-2 wt y la forma mutante CRMP-2 T555A fueron co-electroporados en combinación con el vector de tubulina-GFP en ratones de la cepa C57Bl/6 de 3 meses de edad. Una semana después de la electroporación se les realizó una contusión en el nervio ciático (3 animales por grupo). Luego los animales fueron tratados con una única dosis de 1 mg del anticuerpo 1B7 24 h posteriores a la contusión. La regeneración axonal fue analizada 12 días más tarde en un segmento del nervio ciático distal a la zona de la contusión, mediante la cuantificación del número de axones a 100 μ m, 200 μ m y 300 μ m distales a la zona de la lesión. Observamos que el tratamiento intra-peritoneal con el anticuerpo 1B7 indujo una fuerte inhibición de la regeneración axonal en los ratones electroporados con CRMP-2 wt (Figura 16A). Por el contrario, los axones que sobreexpresaban la forma mutante de CRMP-2 (T555A) mostraron una capacidad regenerativa robusta a pesar de la presencia del anticuerpo 1B7 (Figura 16B). La cuantificación de la regeneración axonal (medida como la relación entre el número de axones post-lesión respecto al número de axones pre-lesión) indicó que más del 70% de los axones provenientes de las DRG que sobreexpresaban CRMP-2-T555A regeneraron a 300 μ m post-lesión mientras que sólo el 20% de los axones que sobreexpresaban CRMP-2 wt alcanzaron esa distancia (Figura 16D). Estos resultados confirmaron *in vivo* el rol de CRMP-2 como mediador del efecto inhibitorio de anticuerpos anti-gangliósidos en la regeneración nerviosa (Esquema 3).

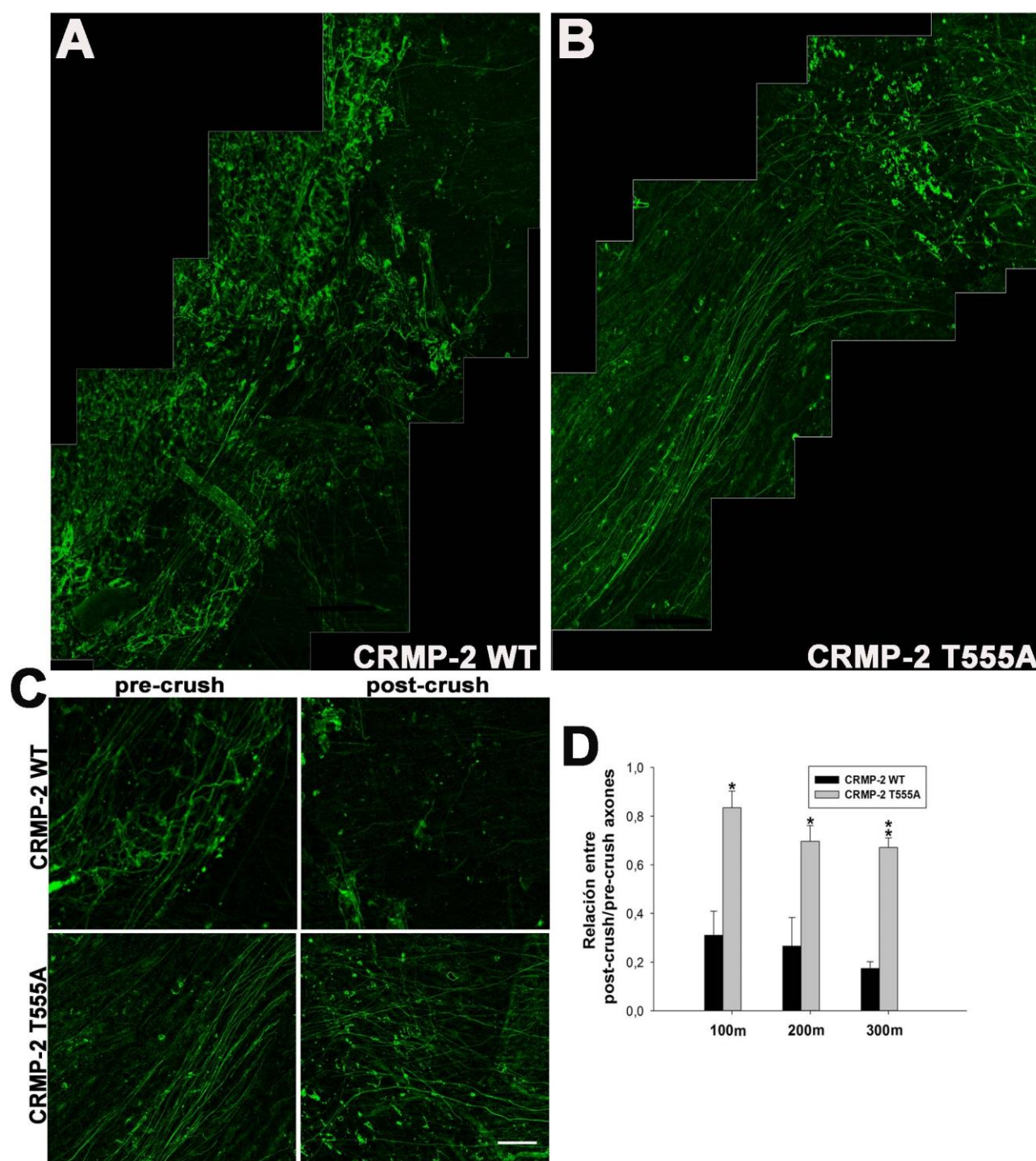
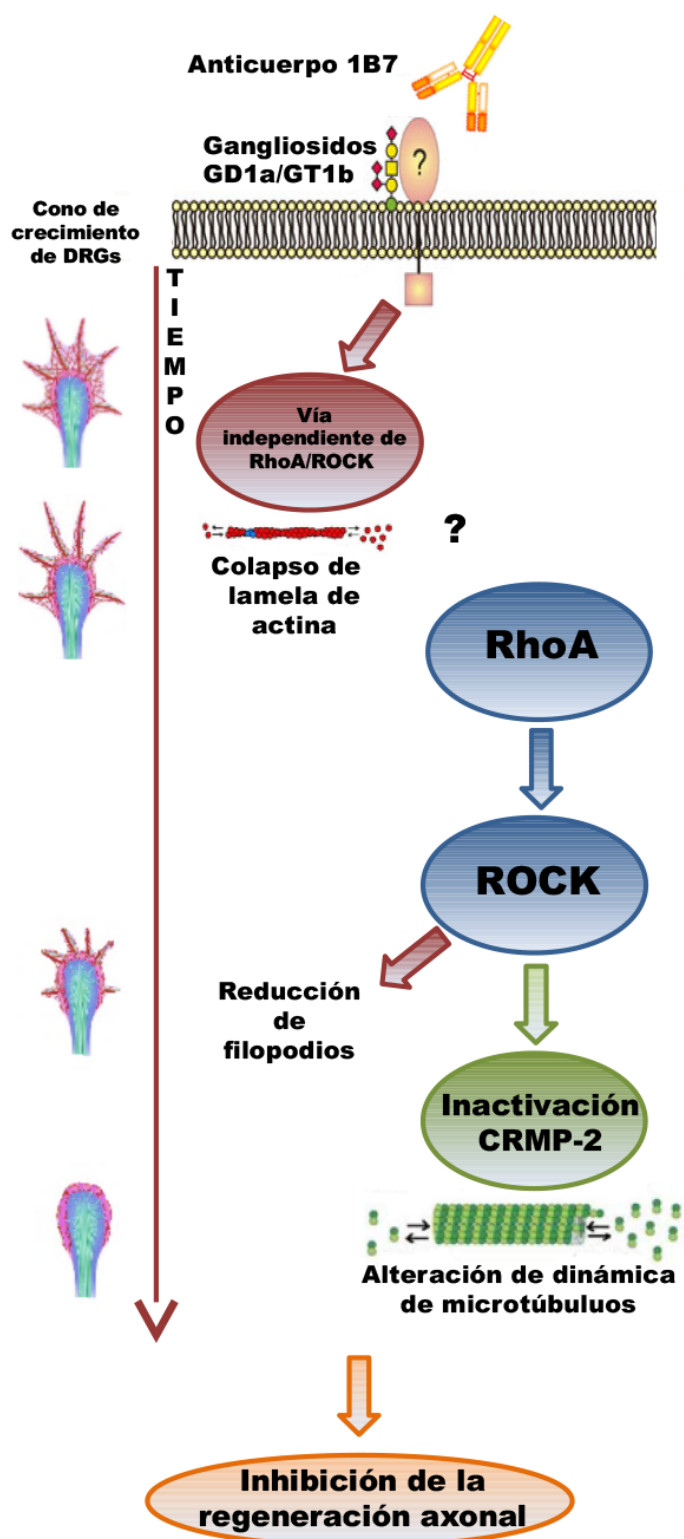


Figura 16: La electroporación in vivo de CRMP-2 T555A revierte la inhibición de la regeneración axonal producida por el anticuerpo 1B7. Animales de la cepa C57Bl/6 fueron co-electroporados con CRMP-2 wt o CRMP-2 T555A y tubulina-GFP en las DRGs L4-L5. Luego se les realizó una contusión del nervio ciático a nivel del muslo medio y posteriormente una inyección i.p. de 1mg de anticuerpo 1B7. Imágenes representativas de los nervios electroporados con CRMP-2 wt (**A**) y con CRMP-2 T555A (**B**). **C**: Magnificación de las zonas pre-lesión y post-lesión en ambas condiciones experimentales. **D**: Cuantificación de la regeneración axonal medida como la relación entre el número de axones distales (100, 200 y 300 μm) a la lesión normalizado con el número de axones proximal a la zona de lesión. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, n: 3 animales en cada grupo, T de Student. Las barras indican ESM.



Esquema 3: Representación de los mecanismos moleculares que subyacen al efecto del anticuerpo 1B7 sobre conos de crecimiento de DRGs. Cuando el anticuerpo interactúa con los gangliosidos ubicados en la membrana desencadena eventos de transducción de señales tanto de forma dependientes e independientes de la vía mayoritariamente asociada a procesos de inhibición de la regeneración axonal (RhoA/ROCK), mostrando efectos diferenciales sobre los componentes del citoesqueleto del cono.

En función de los resultados obtenidos, decidimos continuar con el estudio de las vías de señalización relacionadas con el colapso de la lamela en forma independiente de la vía de RhoA/ROCK en el cono de crecimiento de neuronas DRGs. Para esto, y mediante la técnica de FRET, se analizó la actividad de las otras dos pequeñas GTPasas implicadas en la modulación de los componentes del citoesqueleto, Cdc42 y Rac1. Cultivos de neuronas DRGs fueron electroporadas con el biosensor de Cdc42 y Rac1 basado en FRET y cultivadas por 24 h para permitir la apropiada expresión de los mismos. Luego las células fueron mecánicamente dissociadas y re-sembradas por 5 h para permitir el proceso de extensión de neuritas. La actividad de Cdc42 y Rac1 se cuantificó en conos de crecimiento de neuronas DRGs tratadas con el anticuerpo 1B7 (50 µg/ml) a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 90 min), (Figura 16). Se observó que el tratamiento con el anticuerpo 1B7 no tiene efecto sobre la actividad de Cdc42 (Figura 17 A y C). Sin embargo, encontramos una caída transitoria de la actividad de Rac1 a los 15 min post-tratamiento (Figura 17 B y D). Numerosos trabajos demuestran la relación de esta pequeña GTPasa con la lamela de actina en conos de crecimiento, por lo que este hallazgo podría explicar el mecanismo por el cuál el anticuerpo 1B7 produce el colapso de la misma.

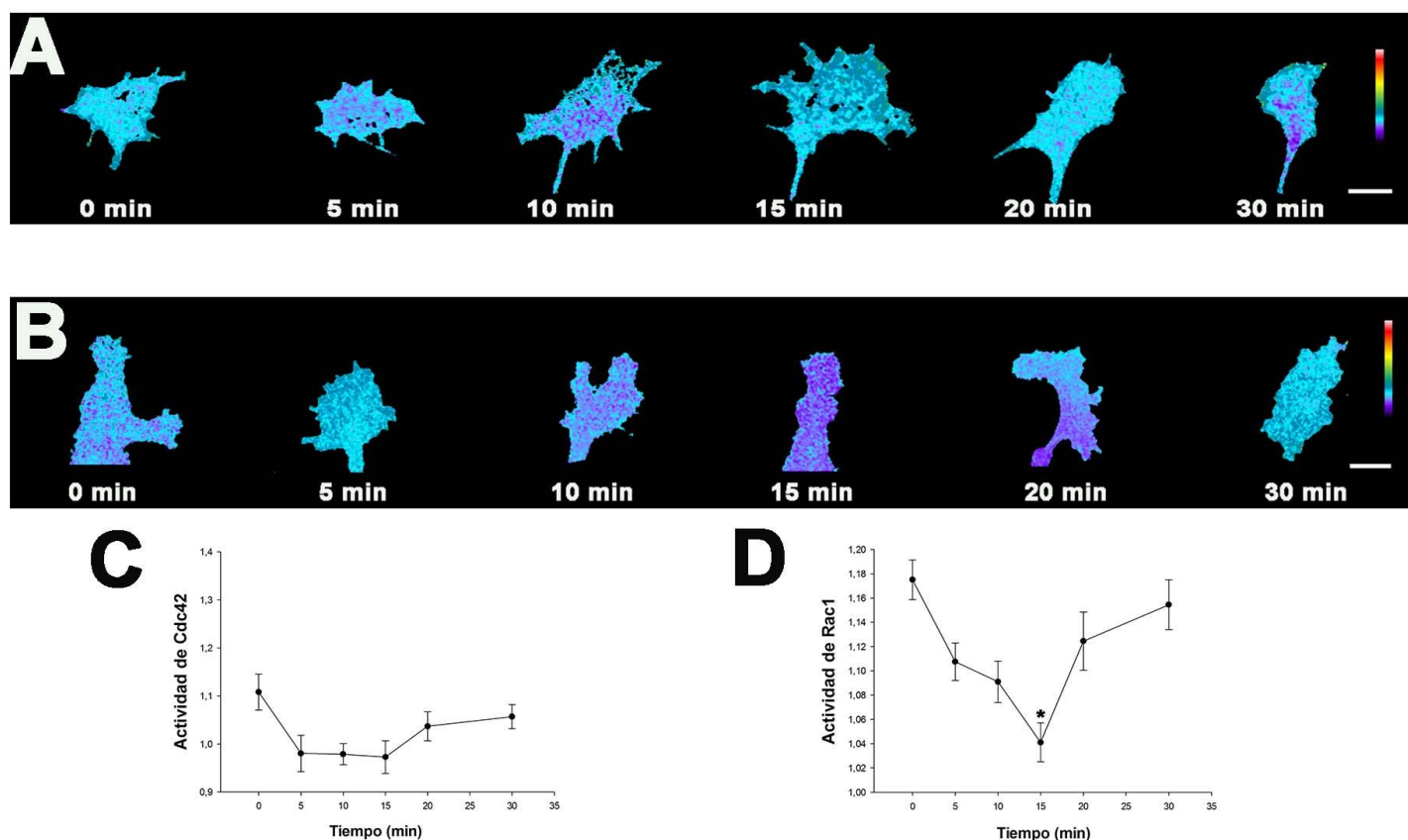


Fig.17: El tratamiento de cultivos de DRGs con el anticuerpo 1B7 induce inactivación temprana de Rac1. Neuronas DRGs fueron electroporadas con el biosensor basado en FRET de Cdc42 y Rac1 5 h antes de tratarlas con 50 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo 1B7. **A y B:** Microfotografías tomadas a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 90 min) luego del tratamiento con el anticuerpo 1B7 son ilustradas en un mapa termal de pseudo-color que muestra la activación de RhoA en conos de DRGs (colores fuertes, alto FRET; colores fríos, bajo FRET). **C y D:** Cuantificación de la actividad de Cdc42 y Rac1 respectivamente. * $p < 0,05$ ANOVA-LSD Fisher, $n: 3$ experimentos independientes. Las barras indican ESM. Barras: 20 μm .

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis demostramos que el anticuerpo 1B7 asociado al Síndrome de Guillain-Barré genera alteraciones en los componentes del citoesqueleto del cono de crecimiento de neuronas sensitivas. A su vez, demostramos que estas alteraciones se producen mediante la activación de vías de señalización tanto dependiente como independiente de RhoA/ROCK y la inactivación/fosforilación de una proteína directamente relacionada con la estabilidad de microtúbulos (CRMP-2). Por último, demostramos que la modulación de CRMP-2 es capaz de prevenir el efecto inhibitorio producido por el anticuerpo en un modelo *in vivo*.

Existen numerosos trabajos que relacionan la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-gangliósidos con recuperación incompleta y/o mala prognosis en el Síndrome de Guillain-Barré (Annunziata et al, 2003; Bech et al, 1997; Carpo et al, 1999; Gregson et al, 1993; Ilyas et al, 1992; Jacobs et al, 1996; Kuwabara et al, 1998; Press et al, 2001; Simone et al, 1993). En muchos casos, las fallas en la recuperación clínica están asociadas con alteraciones o deficiencias en la regeneración axonal (Sheikh, 2011). Trabajos anteriores identificaron que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-gangliósidos monoclonales o derivados de pacientes con GBS actúan como factores inhibitorios en un modelo animal de regeneración axonal generando conos de crecimiento distróficos en los nervios periféricos (Lehmann et al, 2007; Lopez et al, 2010). En este sentido, en el presente trabajo se desarrolló un modelo ex-vivo de inhibición de la regeneración axonal producido por el anticuerpo 1B7 en el que se encontraron conos de crecimiento de tipo distróficos en los extremos de los axones inhibidos, similares a los descritos primeramente por Ramón y Cajal en el sistema nervioso central y visualizados en el modelo animal de regeneración axonal mencionado anteriormente; cuya importancia radica en la posibilidad de realizar estudios que permitan la comprensión de los mecanismos de formación de dichos conos, que aún no es conocido, como así también su posible modulación mediante la intervención farmacológica en un modelo que semeja el efecto que presenta el anticuerpo 1B7 sobre la regeneración axonal *in vivo*.

En cuanto a los resultados obtenidos en cultivos neuronales primarios, existen diversos estudios que han demostrado que anticuerpos anti-gangliósidos pueden inhibir el crecimiento neurítico en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRGs) por unión a gangliósidos y a través de la activación de la vía de la pequeña GTPasa RhoA y su kinasa asociada (ROCK), la cual es una cascada de señalización común a otros inhibidores de la regeneración axonal bien establecidos (Mehta et al, 2007; Zhang et al, 2011). En función de estos antecedentes, realizamos una caracterización detallada de los efectos del anticuerpo 1B7 en la organización del citoesqueleto neuronas DRGs en

cultivo. Es importante resaltar en este punto que las conclusiones obtenidas en este modelo y las diferencias encontradas en cuanto a los resultados publicados hasta el momento, se deben exclusivamente al experimento de video-microscopía. Esta técnica permitió visualizar una diferencia en la dinámica temporal del efecto del anticuerpo 1B7 sobre los componentes del citoesqueleto y posteriormente identificar la activación de vías de señalización exclusivas a cada efecto. En estos cultivos neuronales, los resultados obtenidos demuestran que el anticuerpo 1B7: i) induce rápidamente un colapso de la lamela independiente de la vía de RhoA/ROCK; ii) produce contracción de los filopodios en forma dependiente de la vía RhoA/ROCK; y iii) inhibe el crecimiento neurítico mediante la fosforilación/inactivación de CRMP-2 en el sitio de la treonina 555 dependiente de la vía RhoA/ROCK en cultivos disociado de DRGs, siendo estos resultados posteriormente corroborados en un modelo animal in vivo de inhibición de la regeneración axonal.

En la bibliografía, existen diversos trabajos publicados sobre inhibidores de la regeneración axonal derivados de mielina y moléculas de guía ampliamente caracterizadas que convergen en la activación de una cascada de señalización común que es la vía de RhoA y su quinasa asociada (ROCK) para inducir el colapso del cono de crecimiento. Un ejemplo de esto es MAG, una lectina de la familia de las proteínas unidoras de ácido siálico con dominios tipo inmunoglobulinas (SIGLEC-4a), la cual reconoce varios receptores axonales incluyendo los gangliósidos complejos GD1a y GT1b (Lopez, 2014). A través de la unión al complejo de receptores formados con gangliósidos GT1b, receptor de Nogo 1 (NgR1), LINGO-1 y el receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) actuando como una molécula transductora, MAG es capaz de inhibir la regeneración axonal mediante la activación de la cascada de señalización RhoA/ROCK. Alternativamente, el receptor de neurotrofinas huérfano TAJ/TROY puede funcionar como una molécula transductora en neuronas que no tienen expresión de p75^{NTR} (Lopez & Schnaar, 2009). La activación de RhoA involucra la interacción del dominio intracelular de p75^{NTR} con el inhibidor de disociación alfa de Rho-GDP (RhoGDI α), y el posterior desplazamiento del complejo Rho-GDI α /RhoA (Yamashita & Tohyama, 2003). Sin embargo, MAG es capaz de inhibir la regeneración axonal a través de la unión a gangliósidos por vías independientes al receptor p75^{NTR} que aún no han sido dilucidadas. Esto refleja en parte la complejidad en cuanto al reclutamiento de diferentes co-receptores y moléculas de señalización por medio de los diferentes receptores axonales en células nerviosas (Mehta et al, 2007; Venkatesh et al, 2007). De manera similar, el anticuerpo 1B7

inhibe la regeneración axonal in cultivos primarios de neuronas DRGs uniéndose a gangliósidos y activando la cascada de señalización de RhoA/ROCK de manera independiente al receptor p75^{NTR} (Zhang et al, 2011). Resultados similares se obtuvieron estudiando el efecto del anticuerpo 1B7 en el modelo animal de regeneración axonal utilizando animales deficientes del receptor p75^{NTR} (Zhang et al, 2011), confirmando la redundancia de este receptor. A pesar que el rol de TAJ/TROY no puede ser excluido, la identificación de una molécula transductora usada por los gangliósidos aún permanece sin dilucidar.

A pesar de ser glicoesfingolípidos ubicuos, los gangliósidos están altamente concentrados en el sistema nervioso. Se expresan en la cara externa de la membrana plasmática, e interaccionan con una gran variedad de receptores de membrana modulando su actividad (Lopez & Schnaar, 2009). Sin embargo, la unión de anticuerpos a gangliósidos puede provocar la activación de receptores de membrana sin que eso implique una interacción directa (Sonnino et al, 2013). Esta observación y la naturaleza lipídica de los gangliósidos suma mayor complejidad a las limitaciones técnicas para estudiar las interacciones moleculares de estos en la membrana celular.

La inhibición de la extensión de neuritas por MIA a través de la vía RhoA/ROCK es llevada a cabo por la modulación de la actividad de varias moléculas efectoras que afectan el citoesqueleto de los conos de crecimiento (Fujita & Yamashita, 2014). Dos principales mecanismos que modulan el citoesqueleto de actina han sido ampliamente descritos: por un lado, el colapso de la lamela a través de la estimulación de la contractilidad de actina-miosina mediante la regulación de la fosforilación/activación de MLC dependiente de ROCK; y por otro, la disrupción del citoesqueleto de F-actina mediante la fosforilación/inactivación de la actividad de cofilina dependiente de la vía de ROCK/LIMK1, que además, dispara la actividad crónica de la fosfatasa Slingshot resultando en un aumento de la actividad de cofilina (Hsieh et al, 2006).

Nuestros resultados referidos a los mecanismos moleculares asociados con el efecto inhibitorio del anticuerpo 1B7 sobre la regeneración axonal resaltan la presencia de vías dependiente e independiente de ROCK. Así, el colapso de la lamela aparece como un primer evento disparado por el anticuerpo 1B7 en el cono de crecimiento y no puede ser prevenido por la inhibición farmacológica de la vía RhoA/ROCK. En este sentido, se ha descrito que la sobreexpresión de Rac1 o de uno de sus GEFs, TIAM1 aumenta la elongación axonal mediante el crecimiento de la lamela de actina (Ehler et al, 1997; Kunda et al, 2001). Estos resultados van en concordancia con los resultados obtenidos, ya que la inactivación de Rac1 en los primeros minutos del tratamiento

coincide con el rápido colapso de lamela que visualizamos en nuestro modelo. En este sentido, un dato a resaltar como limitante para estudiar esta pequeña GTPasa es que no hay comercialmente disponible inhibidores farmacológicos específicos para Rac1 y su modulación mediante la transfección/electroporación con diferentes mutantes se encuentra asociada a fenotipos aberrantes.

En cambio, la contracción de los filopodios y las alteraciones en la organización/dinámica de los microtúbulos siguen a la activación de RhoA en los conos de crecimiento y pueden ser prevenidos por inhibición farmacológica de la vía de RhoA/ROCK. Diversos trabajos anteriores describen que la modulación dependiente de ROCK de la red de microtúbulos por MIA involucra la fosforilación/inactivación de CRMP-2, afectando el ensamblado de los microtúbulos (Mimura et al, 2006). Nuestros resultados demuestran que la unión del anticuerpo a los gangliósidos de la membrana produce la fosforilación/inactivación de CRMP-2 en la treonina 555, sitio dependiente de ROCK, resultando un paso crítico para inhibir la extensión del crecimiento neurítico en cultivos primarios de DRGs. Además, la electroporación *in vivo* de DRGs con la forma mutante no-fosforilable de CRMP-2 en el residuo de la treonina 555 es capaz de sobrepasar la inhibición de la regeneración axonal mediada por el anticuerpo 1B7, corroborando el rol de la vía de señalización de RhoA/ROCK/CRMP-2 en la actividad inhibitoria del anticuerpo sobre la regeneración axonal. En este sentido, hallazgos recientes identifican el rol de CRMP-2 en varias condiciones neurodegenerativas como así también el efecto de la droga antidepresiva y ansiolítica atípica, tianeptina, en la manipulación farmacológica de CRMP-2 y promoción del crecimiento neurítico en DRGs de pollo; lo que en conjunto con nuestros resultados, resalta a CRMP-2 como un potencial blanco terapéutico para promover la regeneración axonal en el SGB (Hensley et al, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis identifican un complejo escenario en el cuál la unión de anticuerpos anti-gangliósidos a las células nerviosas produce la activación de múltiples vías de señalización para inhibir la regeneración axonal, incluyendo una vía de señalización universal que subyace el colapso del cono de crecimiento. Una pregunta importante que necesita ser contestada es si estos procesos de señalización están conectados o poseen una relación causal entre sí o simplemente representa la activación de dos vías independientes en diferentes áreas del cono de crecimiento. En este sentido, se ha demostrado que la proteína CRMP-4 que se une a microtúbulos forma un complejo funcional con RhoA modulando el citoesqueleto de microtúbulos y actina en el cono de crecimiento en respuesta a MIA (Alabed et al, 2006; Khazaei et al, 2014) .

Otras evidencias soportan el rol de factores que modulan las pequeñas Rho GTPasas como consecuencia de su liberación luego de la depolimerización de microtúbulos (Conde et al, 2010; Chuang et al, 2005; Montenegro-Venegas et al, 2010). Nosotros hipotetizamos que, independientemente de la vía de señalización inicial (que de acuerdo a nuestros resultados es la inactivación de Rac1), la retracción o el colapso de lamela libera factores como GEFs que subsecuentemente convergen en la activación de RhoA. Si esto es correcto, entonces drogas que promuevan la estabilidad de F-actina podrían prevenir la activación de RhoA y sobrepasar la inhibición del crecimiento neurítico. Es importante tener en cuenta que en contraste con muchos inhibidores de la regeneración axonal cuya actividad aparece restringida a la cicatriz glial que rodea el sitio de lesión, los anticuerpos anti-gangliósidos son factores solubles que aparecen como señales inhibitorias a lo largo de todo el proceso de regeneración nerviosa, desde el sitio de lesión hasta la reinervación del órgano blanco. Recientemente ha sido propuesto que la regeneración axonal en el sistema nervioso central puede ser promovida por la estabilización farmacológica de microtúbulos mediante el uso de drogas como Taxol, contrapesando la relación retracción/inestabilidad de microtúbulos producida por inhibidores de la regeneración axonal (Erturk et al, 2007; Hellal et al, 2011). Por otro lado, se ha documentado la importancia de la vía de Rho como una señal intracelular clave que regula el crecimiento axonal y que su inactivación promueve la regeneración axonal *in vivo* (McKerracher et al, 2012). En este sentido, se ha sugerido a la enzima C3 transferasa con capacidad permeable a la entrada de la célula (cuyo nombre comercial es Cethrin) como candidata para tratamientos en lesiones de médula por su eficiencia para difundir rápidamente a través de la misma (Lord-Fontaine et al, 2008). El potencial uso terapéutico de Y-27632, un inhibidor específico de ROCK, ha sido también propuesto en muchos estudios pre-clínicos y algunos ensayos clínicos de fase II, emergiendo como un tratamiento exitoso para promover la regeneración axonal en el sistema nervioso central y periférico (Forgione & Fehlings, 2014; McKerracher et al, 2012). Otro inhibidor de la misma vía propuesto ha sido Fasudil clorhidrato, el cuál es utilizado en la clínica en pacientes con isquemia (Xiao et al, 2014). Estudios en neuronas motoras y neuroblastoma, han mostrado la posible eficiencia de este inhibidor en procesos de crecimiento y regeneración axonal (Hiraga et al, 2006; Xiao et al, 2014). Si bien estas terapias resultan promisorias, es sabido que la correcta reinervación del blanco es clave para la recuperación clínica; siendo los componentes del citoesqueleto y en especial la actina una pieza fundamental para guiar correctamente al cono de crecimiento hacia el órgano blanco. En

los nervios periféricos, los axones son guiados por factores liberados por las células de Schwann y por sus órganos blanco (Scheib & Hoke, 2013). Por lo tanto, tratamientos farmacológicos que inducen el ensamblado/estabilización de microtúbulos, a pesar de que promueven la extensión axonal, pueden resultar inadecuados para promover de manera precisa y eficiente la reinervación del blanco debido a su inhabilidad de restablecer la lamela de actina en el cono de crecimiento en pacientes con SGB que presentan alto títulos de anticuerpos IgG anti-gangliósidos. Es por esto que futuros trabajos deberán enfocarse en el estudio de la posible interacción que pueda haber entre vías dependientes e independientes de RhoA/ROCK a través de GEFs cuya ubicación y función se encuentre relacionada con los componentes del citoesqueleto en el cono de crecimiento. Además, si esta comunicación entre las vías logra confirmarse, entonces es probable que al bloquear los efectos negativos del anticuerpo 1B7 sobre la lamela de actina sea posible revertir el efecto del anticuerpo sobre la vía de RhoA/ROCK y más específicamente sobre los filopodios y la dinámica de microtúbulos. Por último, estudios que demuestren la eficiencia de reinervación del órgano blanco son necesarios para entender si la modulación farmacológica de ciertos blancos terapéuticos relacionados con el efecto inhibitorio producido por el anticuerpo 1B7 son efectivas para lograr no sólo aumentar la capacidad regenerativa del axón sino también su funcionalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos disociados de neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRGn):

Neonatos de rata Wistar de entre 5-7 días de vida fueron decapitados y los ganglios de la raíz dorsal (DRG) removidos quirúrgicamente. Luego fueron disociados mediante tratamiento con 0.2% de colagenasa durante 13 min con el posterior agregado de 0.1% de tripsina en medio DMEM durante 25 min (tiempo de enzimas considerado para 25-30 ganglios) y luego triturados con tips de pipetas de diámetro decreciente. La suspensión celular obtenida fue sedimentada mediante centrifugación a 100xg por 1 min. Las células fueron luego resuspendidas en medio DMEM y sembradas en placas de Petri de 35 mm por 1 hora para separar las neuronas DRGs (150-200 x10³ aprox.) de la glía. Las células no adheridas (mayoritariamente neuronas DRGs) fueron luego sembradas en vidrios (previamente tratados con 10 µg/ml de poli-L-lisina y 1 µg/ml de laminina-1 de ratón) en medio DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS por sus siglas en inglés), 1% de penicilina/estreptomicina y glutaMAX por 1 h. Luego el medio fue removido y las células fueron mantenidas en medio Neurobasal suplementado con B27, 1% de penicilina/streptomicina, glutaMAX y 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés).

Co-cultivo de explanto de DRG-nervio ciático:

Neonatos de ratón C57/Bl6 de entre 5-7 días fueron decapitados y los DRG junto con segmentos de nervio ciático fueron removidos quirúrgicamente y luego colocados sobre vidrios (previamente tratados con nitrocelulosa-5 cm²-diluídos en 0.02% de ácido acético- y luego con colágeno 0.5M). Tanto los explantos como los segmentos de nervio fueron ubicados en proximidad uno del otro y mantenidos con medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 5% suero de caballo (HS, por sus siglas en inglés), glutaMAX, 1% de penicilina/estreptomicina y 25 ng/ml de NGF a un volumen de medio que deje expuesto la mitad de volumen ¿?½ sin cubrir los co-cultivos. Los mismos fueron mantenidos durante 72 horas para permitir la regeneración de los axones de los explantos de DRGs sobre los segmentos de nervio. Luego fueron fijados con 4% de paraformaldehído 4% durante 1.30h a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes de los cultivos mediante reconstrucción por microscopia confocal y se procedió al análisis de las imágenes cuantificando los axones presentes a 100 µm desde el comienzo del segmento del nervio próximo al DRG). En los conos, se cuantificó la intensidad de la marca de β-III-tubulina y el tamaño fue medido como la relación

entre el diámetro del cono/axón (Erturk et al, 2007).

Electroporación in vitro:

Neuronas dissociadas (1 millón de células) fueron transfectadas con plásmidos utilizando el NucleofectorAMAXA® con el kit (Lonza) Básico de Neurona SCN Nucleofector® o alternativamente con la solución de electroporación Ingenio (Mirrus) con 0.5-2 µg de ADN dependiendo de cada constructo utilizando el programa específico para este linaje neuronal de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Anticuerpo monoclonal Anti-gangliósidos:

La generación, especificidad y purificación del anticuerpo anti-GD1a/GT1b IgG2b (clon 1B7) fue producido en un ratón knockout y reportado en estudios previos (Gong et al, 2002; Lunn et al, 2000; Zhang et al, 2004), incluyendo su potente capacidad de inhibir la regeneración axonal en un modelo animal (Lehmann et al, 2007). IgG de suero de ratón normal fue utilizada como control negativo del anticuerpo.

Tratamientos:

Neuronas DRG dissociadas fueron tratadas 5 h post sembradas con el anticuerpo anti GD1a/GT1b o IgG control (50 µg/ml) y analizadas a diferentes tiempos. En los experimentos en que se utilizó el inhibidor de la proteína Rho I (Exoenzima C3 permeable a la membrana celular, la cuál ADP ribosila Rho en el sitio Ans-41, Cytoskeleton), las células fueron tratadas con 1 µg/ml del mismo 1 h antes de la adición del anticuerpo 1B7 ó IgG control a los cultivos. Para los experimentos con el inhibidor de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK, Y-27632, Calbiochem), los cultivos fueron tratados con dosis de 2 ó 10 µM del mismo 30 min antes de la adición del 1B7 o IgG control. En otro set de experimentos, los cultivos fueron pre-tratados por 1 h con 10 mU/ml de *V. cholerae* sialidase, una enzima que hidroliza ácidos siálicos y elimina la unión del anticuerpo 1B7 a los gangliósidos GD1a y GT1b que son hidrolizados a GM1 (Mehta et al, 2007).

En el caso de los co-cultivos de explanto de DRG-nervio ciático, los mismos fueron tratados a las 24 y 48 h con la aplicación directa sobre los nervios de 1µl (1mg/ml) del anticuerpo 1B7 o IgG control.

Constructos de ADN:

Las secuencias de ADN para α -tubulina humana fusionada a la proteína verde fluorescente (tubulina-GFP) expresada en el vector pcDNA 3.1 (Invitrogen) y para el biosensor de F-actina LifeAct-mCherry (Ibidi®) fueron utilizadas en los experimentos de video microscopía. Los constructos pXJ40FLAG conteniendo las secuencias de rata para CRMP-2 salvaje y una forma mutante en el residuo 555 (CRMP-2 T555A) fueron generosamente provistos por la Dr. Christine Hall (University College London, London, UK) y su uso previamente reportado (Brown et al, 2004; Hall et al, 2001). Estos constructos fueron usados para experimentos de electroporación in vitro e in vivo. Para los experimentos de extensión de neuritas también fue utilizado el vector pMAX el cuál está contenido en el kit (Lonza) Básico de Neurona SCN Nucleofector® como control de electroporación.

Microinyección de células:

Neuronas DRG disociadas luego de sembradas y mantenidas durante 1h en medio con NGF (tiempo suficiente para que se adhieran al sustrato y comiencen a extender neuritas), fueron nucleoinfectadas con Tubulina-GFP y Lifeact-mCherry (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cada uno de los plásmidos) utilizando capilares de borosilicato de vidrio y buffer con HEPES (10 mM) y KCl (140 mM) pH: 7.4 como se describe (Zhang & Yu, 2008). El equipo utilizado para microinyectar fue el Microinjector 5242 Eppendorf®, en el cuál se programaron las siguientes presiones: P1 (presión del tubo de nitrógeno): valores entre 3000-7000 hPa; P2 (presión de inyección): valores entre 40-2000 hPa; P3 (presión que no permite que vuelva flujo hacia adentro del capilar): valores entre 20-700 hPa, se lo mantuvo entre 80-100 hPa. Las células fueron mantenidas durante el tiempo en que se las microinyectaba con temperatura controlada y no más de 45 min fuera del incubador, en medio Leibovit's L15 (Invitrogen), por lo que aproxim. 100 células fueron microinyectadas en ese tiempo por condición.

Video microscopía:

Neuronas DRG disociadas fueron co-nucleoinfectadas con tubulina-GFP y LifeAct-mCherry. Luego de 5 h post-nucleoinfección, las células fueron tratadas con 1B7 ó IgG control y seguidas durante 1.5h por video microscopía (adquiriendo imágenes cada 15 min) utilizando un microscopio de disco giratorio (Spinning Disk Olympus DSU) con un objetivo de inmersión de

60x/1.42 NA. Para el seguimiento de las neuronas en el microscopio se procedió al armado de una cámara que permitió mantenerlas con medio de cultivo durante el tiempo de estudio.

Inmunofluorescencia:

Neuronas DRG disociadas fueron fijadas por 20 min con paraformaldehído 4% y lavadas 3 veces con PBS 1X. Luego fueron incubadas por 1.30 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS, 5% HS, 0.02% Triton X-100 (Sigma)). Los anticuerpos primarios (anti-TUJ1 (covance); dilución 1:2000), anti- α -tubulina acetilada (Lys40 (Cell Signaling); dilución 1:500) o anti-tubulina tirosinada (clone TUB-1A2 (Sigma); dilución 1:1500) fueron resuspendidos en solución de bloqueo y agregados al cultivo por 2 h a temperatura ambiente. La inmunoreactividad fue detectada usando anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con Alexa Fluor® 488 ((Invitrogen); dilución 1:500), IgG biotinilado anti-conejo (dilución 1:500) y Streptavidina Cy3 ((Jackson ImmunoResearch Laboratories, JIL); dilución 1:500) y anticuerpo Cy3- anti-ratón ((JIL); dilución 1:500) respectivamente y el marcador de F-actina Acti-stain 555 Faloidina fluorescente ((Cytoskeleton); dilución 1:250) por 1.30 h a temperatura ambiente. Los cultivos fueron montados con Mowiol (Sigma- Aldrich).

Los co-cultivos fueron incubados con solución de bloqueo (PBS 1X, 5% HS y 0.2% Triton x-100) durante 1.30h a temperatura ambiente. Luego fueron incubados toda la noche con el anticuerpo primario anti-beta-III-tubulina (TIJ-1, dilución 1:2000) y posteriormente la inmunoreactividad fue detectada con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (dilución 1:500) en una incubación de 2 horas.

Fijación de Citoesqueleto:

En algunos cultivos disociados de DRG, se llevó a cabo un tipo de fijación que permite la preservación de la membrana plasmática, endomembranas y componentes del citoesqueleto. Para dicha fijación, se preparó un buffer PHEM 2X con Pipes (18,14g), Hepes (6,5g), EGTA (3,8g) y $MgSO_4$ (0,99g) (para 500 ml de buffer). Luego se procedió a la preparación del fijador con PHEM (2X), Glutaraldehído (0.25%), Paraformaldehído (3,7%), Sucrosa (3.7%) y Tritón x-100 (0.1%). Se fijaron los cultivos durante 20 min a temperatura ambiente y luego se procedió a la inmunomarcación correspondiente.

Electroforesis de proteína:

Células CHO-K1 (ATCC, Manassas, VA, USA) genéticamente modificadas para expresar los gangliósidos GM1 y GD1a (CHO-K1GD1a+, descritos como clone 4 en (Crespo et al, 2002) y generosamente provistas por el Dr. J. Daniotti, Universidad Nacional de Córdoba) fueron transfectadas con 1 µg/µl del vector pXJ40FLAG conteniendo la secuencia para CRMP-2 salvaje usando Lipofectamina 2000 (0.4 µl/well) en OptiMEM (Invitrogen). Las células fueron mantenidas por 24-48 h para permitir la expresión del ADNc y luego tratadas con 1B7 (50 µg/ml) por diferentes tiempos y luego recolectadas y homogeneizadas en buffer RIPA conteniendo 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2 con el agregado de una mezcla de inhibidores de proteasas comercial (Sigma, P8340). Los homogenatos fueron hervidos por 5 min. Luego de centrifugar las muestras (13,000 rpm, 10 min, 4°C), el contenido de proteínas presente en los sobrenadantes fue determinado usando un ensayo DC™ (Bio-Rad Life Science). Los homogenatos celulares fueron diluídos en buffer Laemmli y separados en un gel al 10% de SDS-poliacrilamida, sembrándose 100 µg/ calle. La inmunodetección fue realizada utilizando un anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-CRMP2 reconociendo un sitio de fosforilación treonina 555 (Tre 555), (dilución 1:100 (ECM Biosciences)). Para asegurar que la misma cantidad de proteína fue sembrada, se realizó un control de carga para normalizar la inmunoreactividad con un anticuerpo anti-tubulina, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-α-tubulina ((clone 12G10); dilución 1:1000) y el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón (anti-ratón IgG-HRP de cabra) (dilución 1:5000; JIL)). El anticuerpo 12G10 generado por los investigadores Frankel y Nelsen fue obtenido del Developmental Studies Hybridoma Bank bajo el auspicio de NICHD y mantenido en la University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA. Las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (ECL, Amersham Life Science). La presencia de las bandas se detectó mediante autoradiografía utilizando placas radiográficas de uso médico (Agfa X-ray film,). Las autoradiografías fueron luego digitalizadas por medio de un scanner y el análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el uso del software Scion Image for Windows (Scion Corporation). Los valores densitométricos de pCRMP-2 se normalizaron con respecto a los del anticuerpo anti-α-tubulina y dichos valores fueron utilizados para el posterior análisis estadístico.

Análisis de morfología de los conos de crecimiento:

En los cultivos disociados, el área de lamela fue definida como: Área de lamela= Área de F-actina-Área de beta-III-tubulina (Laishram et al, 2009). Para analizar la dinámica de los MTs, se cuantificó la relación entre las áreas abarcadas por ambos tipos de tubulina. La relación o radio de tubulina fue definido como el Área de tubulina acetilada/ Área de tubulina tirosinada (Witte & Bradke, 2008). La longitud de filopodios fue medida desde la base del filopodio hasta el final. Tanto la superficie del área del cono de crecimiento y la longitud de filopodios fueron medidos con el software Fiji (una plataforma abierta); (n= 40-60 conos de crecimiento por grupo).

Estudios de extensión de neuritas:

Neuronas DRG disociadas electroporadas con CRMP-2 salvaje o la mutante CRMP-2 T555A fueron cultivadas por 24 h. A la hora de sembradas fueron tratadas con 1B7 ó IgG control (50 µg/ml). Luego de las 24 h, fueron fijadas por 20 min con paraformaldehído 4% y se les realizó una inmunotinción con el anticuerpo primario anti-FLAG (dilución 1:500; (Sigma-Aldrich)) y con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 conjugado (dilución 1:500; (Molecular Probes)) para detectar las neuronas positivamente electroporadas. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia (Zeiss) usando un objetivo de aire de 20X/0.8 NA y analizadas con el software Fiji. La longitud de la neurita más larga de cada neurona fue medida (\geq al diámetro del cuerpo celular); (n = 60–80 neuronas por grupo).

Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET):

Neuronas DRG disociadas fueron electroporadas con biosensores basados en la técnica de microscopia FRET diseñados específicamente para medir la actividad de las distintas pequeñas GTPasas: RhoA, Rac1 y Cdc42 (ver apartado de biosensores). Las células fueron cultivadas durante 24h para permitir la correcta expresión de los biosensores y luego re-sembradas (Saijilafu & Zhou, 2012). Luego de 5h fueron tratadas con 1B7 (50 µg/ml) por diferentes tiempos. Las células fueron fijadas por 20 min con paraformaldehído/sucrosa 4%, montadas y las eficiencias de FRET estimadas como se describe a continuación.

Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal de disco giratorio (DSU) con láser multilínea de Argon 40 mw Modelo 35-IMA 040-220 de CVI MellesGriot, utilizando un

objetivo de inmersión de 60 x/1.42 NA. Se adquirieron pares de imágenes de manera simultánea del canal del donor (excitación del donor y adquisición en el canal del donor: 480-495nm) y otra del canal de FRET (excitación del donor y adquisición en el canal del aceptor: 535-565nm) excitando solo el donor con un láser de 458nm. Tanto el procesamiento de las imágenes como el cálculo del mapa de FRET fueron realizados usando el programa Fiji. Para el cálculo del mapa de FRET se utilizó la siguiente fórmula:

Mapa de FRET: Canal de FRET/Canal del donor

Para el procesamiento de las imágenes, se aplicó un filtro de mediana de 1,2 píxeles de radio, se les sustrajo la señal de fondo y se corrigió la iluminación desigual mediante la función “background subtraction” del programa Fiji. Luego se corrigió cualquier posible desalineamiento entre las imágenes del canal donor y el canal de FRET mediante la función “stackreg”. Con la imagen del canal de FRET, se generó una máscara binaria para eliminar el análisis de cualquier región de la imagen que no fuera la célula de interés. Las cuantificaciones se realizaron seleccionando áreas de interés (conos de crecimiento) sobre imágenes en las que los píxeles fuera de las células no fueran considerados cuantificables por el programa (función NaN). Estas se generaron dividiendo los mapas de FRET por las máscaras binarias, ya que en las mismas, las regiones fuera de la célula valen 0.

Biosensores utilizados para FRET:

En todos los casos, para medir actividad de las pequeñas GTPasas se utilizaron biosensores considerados unimoleculares, lo que significa que en la misma cadena proteica se encuentran el donor y el aceptor y el tipo de transferencia de energía mediante FRET del donor hacia el aceptor es intramolecular. En el estado inactivo, la estructura tridimensional del biosensor mantiene una orientación y/o distancia entre el donor y el aceptor de manera que la eficiencia de FRET es baja mientras que al activarse, se produce un cambio estructural que acerca el donor al aceptor y cambia su orientación relativa de manera que la eficiencia de FRET aumenta (Figura 17).

La transfección transiente con estos biosensores basados en FRET de RhoA (Addgene cat. #12150, (Pertz et al, 2006), 2µg), Rac1 y Cdc42 ((Itoh et al, 2002), 3µg) fue realizada por electroporación de

neuronas disociadas de DRGs con los ADN. Es importante destacar que los biosensores utilizados para Rac1 y Cdc42 son los llamados Raichu, cuya diferencia con el biosensor de RhoA radica en que los primeros están anclados a la membrana a través de la región C-terminal y además, no se unen a RhoGDI, por lo que las limitaciones que tienen es que sólo sirven para evaluar el balance entre GEFs y GAPs pero no el efecto de RhoGDI.

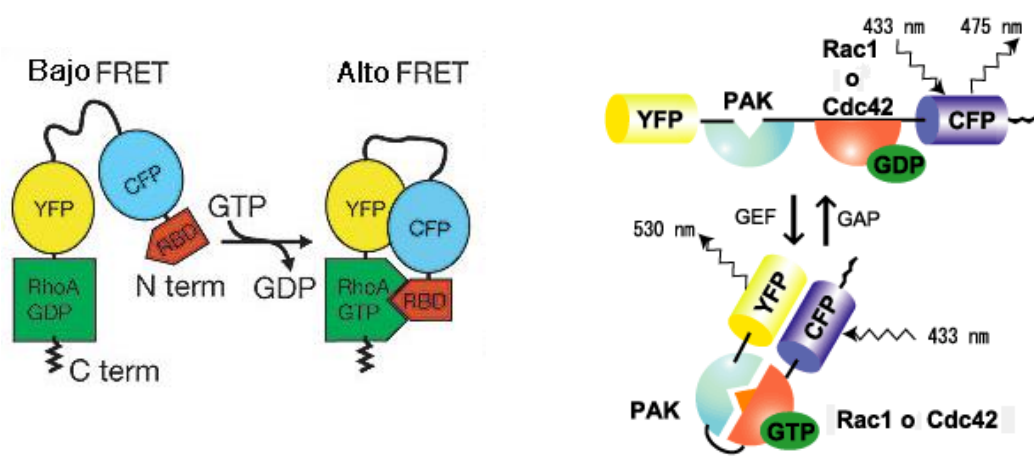


Figura 17: Representación de los biosensores basados en FRET para las pequeñas GTPasas utilizadas en el presente trabajo. En todos los casos son biosensores unimoleculares ya que el aceptor y el donador se encuentran en la misma cadena. Esquemas modificados de Pertz et al., 2006 y Itoh RE et al., 2002.

Electroporación in vivo:

Ratones machos de la cepa C57/Bl6 de entre 8-10 semanas de vida fueron anestesiados con una inyección intra-peritoneal de la mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xylazina (10 mg/kg). Luego se les realizó una hemilaminectomía dorsal y los ganglios de la raíz dorsal fueron expuestos (Figura 18) y se les inyectó, mediante bomba de inyección de gas, 1-2 μ g de ADN correspondiente a CRMP-2 salvaje y la forma mutante CRMP-2 T555A junto a tubulina-GFP para permitir la visualización de los axones electroporados. Se electroporaron los ganglios correspondientes a la región lumbar 4 o 5 (L4 ó L5) utilizando los parámetros descritos (Saijilafu et al, 2011). Luego de la electroporación, la herida fue cerrada y se esperó la recuperación de los animales antes de volver a sus cajas. Todos los experimentos que involucran animales fueron realizados de acuerdo a los protocolos animales aprobados por nuestro Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

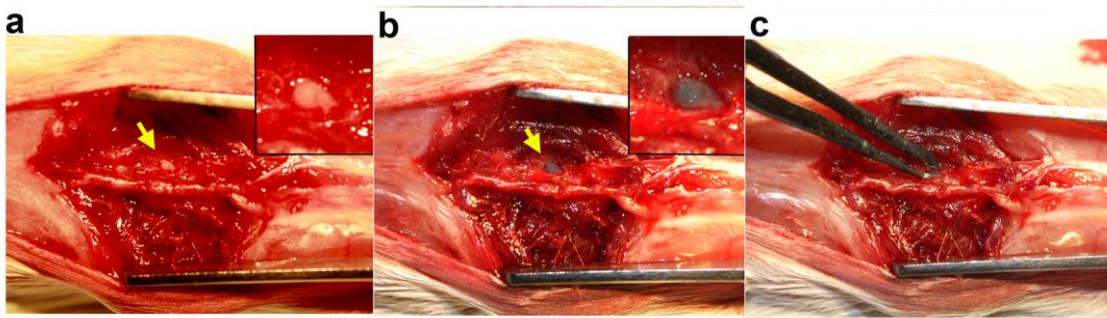


Figura 18: Representación del modelo de electroporación *in vivo*. Esquema de la hemilaminectomía (a), exposición del ganglio de la raíz dorsal (b) y posterior electroporación (c). Figura modificada de Saijilafu et al, 2012.

Modelo de Lesión de Nervio Ciático:

Se utilizó un modelo estandarizado de lesión de nervio ciático (Lopez et al, 2010). A los nervios derechos se les realizó una contusión a 35 mm rostral del dedo medio con una pinza fina (Figura 19), una semana luego de la electroporación de los ganglios. La separación proximal y distal del contenido endoneural fue considerado indicador de una lesión completa. Dos grupos de animales electroporados con CRMP-2 salvaje y la forma mutante CRMP-2 T555A (n= 3 por grupo) recibieron una única dosis de inyección intra-peritoneal (IP) de 1 mg de 1B7. El día 12 post lesión, los nervios ciáticos fueron removidos, post fijados con paraformaldehído 4% a 4°C y procesados para el análisis de inmunofluorescencia. Las imágenes de los nervios montados fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus FV1000 equipado con una cámara CCD controlada por el software Fluoview (Olympus). Cada axón identificable marcado con tubulina-GFP de los nervios, ubicado 100 μ m proximal al sitio de lesión, fue manualmente trazado a 100, 200 y 300 μ m distal a la lesión para medir la longitud de dicho axones. La regeneración axonal fue cuantificada como la relación entre el número de axones electroporados proximales al sitio de lesión/número de axones electroporados distales al sitio de lesión.

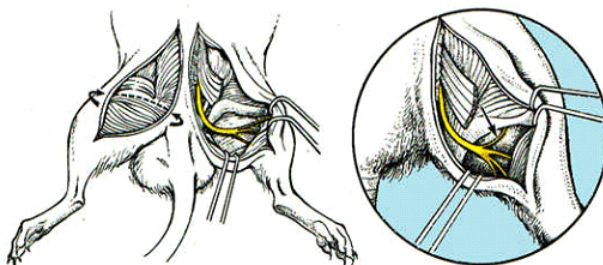


Figura 19: Representación del modelo de lesión de nervio ciático. En la figura se puede observar en amarillo el nervio. La contusión se realiza en la zona media del muslo, zona a partir de la cual, el nervio comienza a ramificarse.

Producción de partículas lentivirales transportando secuencias shARN específicas:

Para la producción del vector lentiviral que contuviera la secuencia que portaba el shRNA (siglas en inglés de short hairpin RNA) específica para silenciar la proteína St3Gal2, se utilizó la siguiente secuencia de oligonucleótidos: 5'-AATTCCAGATTACAACCCAGCCTT-3' (Sigma-Aldrich, Mission shRNA). Dicha secuencia fue clonada en el vector de lentivirus pLKO.3G que expresaba la proteína verde fluorescente (eGFP) (Addgene, Plasmid #14748).

Para la generación de las partículas lentivirales, 7×10^5 células de riñón embrionario humano, HEK293, fueron cultivadas en DMEM conteniendo 10% SFB en placas de cultivo de 6cm. Al momento de la transfección, presentaban entre 60-80% de confluencia en medio sin antibióticos. Las células fueron co-transfectadas con el vector pLKO.3G portando la secuencia transgénica, un plásmido con secuencias de proteínas de empaquetamiento (psPAX2, Addgene, Plasmid #12260) y otro con las secuencias para proteínas de envoltura (pMD2.G, Addgene, Plasmid #12259). Para la transfección, se generó la siguiente mezcla: 1µg pLKO.3G, 750ng psPAX2, 250ng pMD2.G en 20µl de Opti-MEM. Por otro lado, se incubó Lipofectamina 2000 con Opti-MEM durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, ambas mezclas se juntaron y se las incubó por 20 min. La mezcla final se agregó a las células y fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 12-15h. Al día siguiente, la mezcla fue reemplazada por medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% de penicilina-estreptomicina. Una vez incorporados los plásmidos, las partículas virales se forman dentro de las células y son liberadas al medio, motivo por el cual se procedió a colectar el medio a

las 24 y 48h y se lo almacenó a 4°C. El medio fue ultra-centrifugado para concentrar las partículas virales y se les determinó el título viral mediante la infección de células HEK293 y posterior análisis en el citómetro de flujo a través del análisis de la expresión de la proteína GFP.

El tratamiento de los co-cultivos con dichas partículas consistió en el agregado de XXX al medio de los cultivos en el momento de sembrarlos y posteriormente a las 24 y 48h para aumentar la eficiencia de las mismas.

Análisis estadístico:

El análisis de los datos fue realizado utilizando un paquete estadístico estándar (InfoStat System). Todos los valores son representados como el promedio \pm error estándar de al menos 3 experimentos independientes. T de Student ó Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido del test a posteriori LSD-Fisher fueron utilizados para analizar las diferencias.

REFERENCIAS

- Aizawa H, Wakatsuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, Sekine-Aizawa Y, Sehara-Fujisawa A, Mizuno K, Goshima Y, Yahara I (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature neuroscience* **4**: 367-373
- Akhmanova A, Hoogenraad CC (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Current opinion in cell biology* **17**: 47-54
- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 309-322
- Alabed YZ, Grados-Munro E, Ferraro GB, Hsieh SH, Fournier AE (2006) Neuronal responses to myelin are mediated by rho kinase. *Journal of neurochemistry* **96**: 1616-1625
- Ando S, Chang NC, Yu RK (1978) High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. *Analytical biochemistry* **89**: 437-450
- Annunziata P, Figura N, Galli R, Mugnaini F, Lenzi C (2003) Association of anti-GM1 antibodies but not of anti-cytomegalovirus, Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori IgG, with a poor outcome in Guillain-Barre syndrome. *Journal of the neurological sciences* **213**: 55-60
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K (2000) Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *The Journal of biological chemistry* **275**: 23973-23980
- Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, Kaibuchi K (2005) Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Molecular and cellular biology* **25**: 9973-9984
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M (2008) PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* **322**: 967-970
- Bamburg JR (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **15**: 185-230
- Bamburg JR, Bernstein BW (2010) Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 biology reports* **2**: 62
- Barra HS, Arce CA, Argarana CE (1988) Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Molecular neurobiology* **2**: 133-153
- Bech E, Orntoft TF, Andersen LP, Skinhoj P, Jakobsen J (1997) IgM anti-GM1 antibodies in the Guillain-Barre syndrome: a serological predictor of the clinical course. *Journal of neuroimmunology* **72**: 59-66

- Bento CF, Puri C, Moreau K, Rubinsztein DC (2013) The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *Journal of cell science* **126**: 1059-1069
- Brown M, Jacobs T, Eickholt B, Ferrari G, Teo M, Monfries C, Qi RZ, Leung T, Lim L, Hall C (2004) Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 8994-9004
- Brown WF, Feasby TE (1984) Conduction block and denervation in Guillain-Barre polyneuropathy. *Brain : a journal of neurology* **107 (Pt 1)**: 219-239
- Brushart TM, Aspalter M, Griffin JW, Redett R, Hameed H, Zhou C, Wright M, Vyas A, Hoke A (2013) Schwann cell phenotype is regulated by axon modality and central-peripheral location, and persists in vitro. *Experimental neurology* **247**: 272-281
- Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF (2003) Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 7789-7800
- Burnette DT, Schaefer AW, Ji L, Danuser G, Forscher P (2007) Filopodial actin bundles are not necessary for microtubule advance into the peripheral domain of Aplysia neuronal growth cones. *Nature cell biology* **9**: 1360-1369
- Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 4731-4739
- Carpio M, Pedotti R, Allaria S, Lolli F, Mata S, Cavaletti G, Protti A, Pomati S, Scarlato G, Nobile-Orazio E (1999) Clinical presentation and outcome of Guillain-Barre and related syndromes in relation to anti-ganglioside antibodies. *Journal of the neurological sciences* **168**: 78-84
- Clark SE, Moss DJ, Bray D (1983) Actin polymerization and synthesis in cultured neurones. *Experimental cell research* **147**: 303-314
- Coles CH, Bradke F (2015) Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Current biology : CB* **25**: R677-691
- Conde C, Arias C, Robin M, Li A, Saito M, Chuang JZ, Nairn AC, Sung CH, Caceres A (2010) Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 6793-6800
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews Neuroscience* **10**: 319-332
- Corbetta S, Gualdoni S, Albertinazzi C, Paris S, Croci L, Consalez GG, de Curtis I (2005) Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Molecular and cellular biology* **25**: 5763-5776

- Crespo PM, Zurita AR, Daniotti JL (2002) Effect of gangliosides on the distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in plasma membrane from Chinese hamster ovary-K1 cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 44731-44739
- Chen Q, Pollard TD (2013) Actin filament severing by cofilin dismantles actin patches and produces mother filaments for new patches. *Current biology : CB* **23**: 1154-1162
- Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I (1997) Ganglioside composition of the human cranial nerves, with special reference to pathophysiology of Miller Fisher syndrome. *Brain research* **745**: 32-36
- Chuang JZ, Yeh TY, Bollati F, Conde C, Canavosio F, Caceres A, Sung CH (2005) The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Developmental cell* **9**: 75-86
- Darenfed H, Dayanandan B, Zhang T, Hsieh SH, Fournier AE, Mandato CA (2007) Molecular characterization of the effects of Y-27632. *Cell motility and the cytoskeleton* **64**: 97-109
- David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**: 931-933
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, Pasterkamp RJ, Gispen WH, Verhaagen J (2002) Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Experimental neurology* **175**: 61-75
- DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Molecular and cellular neurosciences* **7**: 89-101
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**: 209-227
- Dickson BJ (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Current opinion in neurobiology* **11**: 103-110
- Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *The Journal of biological chemistry* **264**: 16378-16382
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* **35**: 283-290
- Downing KH, Nogales E (1998) Tubulin and microtubule structure. *Current opinion in cell biology* **10**: 16-22
- Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L (2003) Rho activation patterns after spinal cord injury and

- the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *The Journal of cell biology* **162**: 233-243
- Duffy P, Schmandke A, Sigworth J, Narumiya S, Cafferty WB, Strittmatter SM (2009) Rho-associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 15266-15276
- Ehler E, van Leeuwen F, Collard JG, Salinas PC (1997) Expression of Tiam-1 in the developing brain suggests a role for the Tiam-1-Rac signaling pathway in cell migration and neurite outgrowth. *Molecular and cellular neurosciences* **9**: 1-12
- Erturk A, Hellal F, Enes J, Bradke F (2007) Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 9169-9180
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635
- Fawcett JW (2006) Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *Journal of neurotrauma* **23**: 371-383
- Feasby TE, Gilbert JJ, Brown WF, Bolton CF, Hahn AF, Koopman WF, Zochodne DW (1986) An acute axonal form of Guillain-Barre polyneuropathy. *Brain : a journal of neurology* **109 (Pt 6)**: 1115-1126
- Fernandez R, Calleja J, de Pablos C, Berciano J (1983) [Clinico-neurophysiologic correlation in the Guillain-Barre syndrome. A propos of a serial study of 20 patients]. *Archivos de neurobiologia* **46**: 287-298
- Firat-Karalar EN, Welch MD (2011) New mechanisms and functions of actin nucleation. *Current opinion in cell biology* **23**: 4-13
- Fitch MT, Silver J (1997) Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Experimental neurology* **148**: 587-603
- Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology* **209**: 294-301
- Flynn KC (2013) The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture* **3**: 86-109
- Forgione N, Fehlings MG (2014) Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury. *World neurosurgery* **82**: e535-539
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**: 341-346
- Fournier AE, Kalb RG, Strittmatter SM (2000) Rho GTPases and axonal growth cone collapse. *Methods in enzymology* **325**: 473-482

- Fujita Y, Yamashita T (2014) Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Frontiers in neuroscience* **8**: 338
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS (2011) Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation* **8**: 110
- Gobrecht P, Andreadaki A, Diekmann H, Heskamp A, Leibinger M, Fischer D (2016) Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **36**: 3890-3902
- Gobrecht P, Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D (2014) Sustained GSK3 activity markedly facilitates nerve regeneration. *Nature communications* **5**: 4561
- Goldberg JL, Vargas ME, Wang JT, Mandemakers W, Oster SF, Sretavan DW, Barres BA (2004) An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 4989-4999
- Gong Y, Tagawa Y, Lunn MP, Laroy W, Heffer-Lauc M, Li CY, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA (2002) Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *Brain : a journal of neurology* **125**: 2491-2506
- Gonzalez-Billault C, Munoz-Llanca P, Henriquez DR, Wojnacki J, Conde C, Caceres A (2012) The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**: 464-485
- Gregson NA, Koblar S, Hughes RA (1993) Antibodies to gangliosides in Guillain-Barre syndrome: specificity and relationship to clinical features. *The Quarterly journal of medicine* **86**: 111-117
- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR, Macko C, McKhann GM, Asbury AK (1996) Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology* **39**: 17-28
- Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RA, Zielasek J, Hartung HP, Toyka KV, Swan AV (1998) Electrophysiological classification of Guillain-Barre syndrome: clinical associations and outcome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group. *Annals of neurology* **44**: 780-788
- Halstead SK, Zitman FM, Humphreys PD, Greenshields K, Verschuuren JJ, Jacobs BC, Rother RP, Plomp JJ, Willison HJ (2008) Eculizumab prevents anti-ganglioside antibody-mediated neuropathy in a murine model. *Brain : a journal of neurology* **131**: 1197-1208
- Hall C, Brown M, Jacobs T, Ferrari G, Cann N, Teo M, Monfries C, Lim L (2001) Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase. *The Journal of biological chemistry* **276**: 43482-43486
- Hammond JW, Cai D, Verhey KJ (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Current*

opinion in cell biology **20**: 71-76

Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, Doya H, Saito T, Yamagishi S, Mueller BK, Yamashita T (2006) RGMa

inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *The Journal of cell biology* **173**: 47-58

Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 690-701

Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, Flynn KC, Laskowski CJ, Umlauf M, Kapitein LC, Strikis D, Lemmon V, Bixby J, Hoogenraad CC, Bradke F (2011) Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* **331**: 928-931

Hensley K, Venkova K, Christov A, Gunning W, Park J (2011) Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodegeneration indications. *Molecular neurobiology* **43**: 180-191

Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, Kanai K, Fujitani M, Taniguchi J, Arai K, Mori M, Hattori T, Yamashita T (2006) Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **11**: 217-224

Hoke A, Redett R, Hameed H, Jari R, Zhou C, Li ZB, Griffin JW, Brushart TM (2006) Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 9646-9655

Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE (2006) Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 1006-1015

Hughes RA (1992) The management of Guillain-Barre syndrome. *Hosp Pract (Off Ed)* **27**: 107-110, 121-105

Hughes RA, Cornblath DR (2005) Guillain-Barre syndrome. *Lancet* **366**: 1653-1666

Hughes RA, Hadden RD, Gregson NA, Smith KJ (1999) Pathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Journal of neuroimmunology* **100**: 74-97

Hunter AW, Wordeman L (2000) How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *Journal of cell science* **113 Pt 24**: 4379-4389

Hur EM, Saijilafu, Zhou FQ (2012) Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. *Trends in neurosciences* **35**: 164-174

Hur EM, Yang IH, Kim DH, Byun J, Saijilafu, Xu WL, Nicovich PR, Cheong R, Levchenko A, Thakor N, Zhou FQ (2011) Engineering neuronal growth cones to promote axon regeneration over inhibitory

molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 5057-5062

Ilyas AA, Mithen FA, Dalakas MC, Chen ZW, Cook SD (1992) Antibodies to acidic glycolipids in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of the neurological sciences* **107**: 111-121

Inclan YF, Nogales E (2001) Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. *Journal of cell science* **114**: 413-422

Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and cellular biology* **22**: 6582-6591

Jacobs BC, Koga M, van Rijs W, Geleijns K, van Doorn PA, Willison HJ, Yuki N (2008) Subclass IgG to motor gangliosides related to infection and clinical course in Guillain-Barre syndrome. *Journal of neuroimmunology* **194**: 181-190

Jacobs BC, van Doorn PA, Schmitz PI, Tio-Gillen AP, Herbrink P, Visser LH, Hooijkass H, van der Meche FG (1996) Campylobacter jejuni infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology* **40**: 181-187

Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of cell biology* **126**: 801-810

Joset A, Dodd DA, Halegoua S, Schwab ME (2010) Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling. *The Journal of cell biology* **188**: 271-285

Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S (2004) Ganglioside complexes as new target antigens in Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology* **56**: 567-571

Kaplan A, Ong Tone S, Fournier AE (2015) Extrinsic and intrinsic regulation of axon regeneration at a crossroads. *Frontiers in molecular neuroscience* **8**: 27

Khazaei MR, Girouard MP, Alchini R, Ong Tone S, Shimada T, Bechstedt S, Cowan M, Guillet D, Wiseman PW, Brouhard G, Cloutier JF, Fournier AE (2014) Collapsin response mediator protein 4 regulates growth cone dynamics through the actin and microtubule cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **289**: 30133-30143

Koh CG (2006) Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neuro-Signals* **15**: 228-237

Kolter T (2012) Ganglioside biochemistry. *ISRN biochemistry* **2012**: 506160

- Kubo T, Endo M, Hata K, Taniguchi J, Kitajo K, Tomura S, Yamaguchi A, Mueller BK, Yamashita T (2008) Myosin IIA is required for neurite outgrowth inhibition produced by repulsive guidance molecule. *Journal of neurochemistry* **105**: 113-126
- Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K, Caceres A (2001) Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 2361-2372
- Kusunoki S, Kaida K, Ueda M (2008) Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome: new aspects of research. *Biochimica et biophysica acta* **1780**: 441-444
- Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, Ugawa Y, Hitoshi S, Kanazawa I (1996) Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Annals of neurology* **39**: 424-431
- Kuwabara S, Asahina M, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T (1998) Two patterns of clinical recovery in Guillain-Barre syndrome with IgG anti-GM1 antibody. *Neurology* **51**: 1656-1660
- Laishram J, Kondra S, Avossa D, Migliorini E, Lazzarino M, Torre V (2009) A morphological analysis of growth cones of DRG neurons combining atomic force and confocal microscopy. *Journal of structural biology* **168**: 366-377
- Ledeen RW, Yu RK (1982) Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods in enzymology* **83**: 139-191
- Lehmann HC, Lopez PH, Zhang G, Ngyuen T, Zhang J, Kieseier BC, Mori S, Sheikh KA (2007) Passive immunization with anti-ganglioside antibodies directly inhibits axon regeneration in an animal model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 27-34
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 7537-7547
- Letourneau PC (2009) Actin in axons: stable scaffolds and dynamic filaments. *Results and problems in cell differentiation* **48**: 65-90
- Liu J, Chau CH, Liu H, Jang BR, Li X, Chan YS, Shum DK (2006) Upregulation of chondroitin 6-sulphotransferase-1 facilitates Schwann cell migration during axonal growth. *Journal of cell science* **119**: 933-942
- Lopez PH (2014) Role of myelin-associated glycoprotein (siglec-4a) in the nervous system. *Advances in neurobiology* **9**: 245-262
- Lopez PH, Lardone RD, Irazoqui FJ, Villa AM, Di Egidio M, Saizar RD, Sica RE, Nores GA (2001) Variable patterns of anti-GM(1) IgM-antibody populations defined by affinity and fine specificity in patients with motor syndromes: evidence for their random origin. *Journal of neuroimmunology* **119**: 131-136

- Lopez PH, Schnaar RL (2009) Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current opinion in structural biology* **19**: 549-557
- Lopez PH, Zhang G, Bianchet MA, Schnaar RL, Sheikh KA (2008) Structural requirements of anti-GD1a antibodies determine their target specificity. *Brain : a journal of neurology* **131**: 1926-1939
- Lopez PH, Zhang G, Zhang J, Lehmann HC, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA (2010) Passive transfer of IgG anti-GM1 antibodies impairs peripheral nerve repair. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 9533-9541
- Lord-Fontaine S, Yang F, Diep Q, Dergham P, Munzer S, Tremblay P, McKerracher L (2008) Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* **25**: 1309-1322
- Low K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH (2008) Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 1099-1108
- Lowery LA, Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 332-343
- Lucki NC, Sewer MB (2012) Nuclear sphingolipid metabolism. *Annual review of physiology* **74**: 131-151
- Ludueno RF (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International review of cytology* **178**: 207-275
- Lunn MP, Johnson LA, Fromholt SE, Itonori S, Huang J, Vyas AA, Hildreth JE, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA (2000) High-affinity anti-ganglioside IgG antibodies raised in complex ganglioside knockout mice: reexamination of GD1a immunolocalization. *Journal of neurochemistry* **75**: 404-412
- Mackay DJ, Hall A (1998) Rho GTPases. *The Journal of biological chemistry* **273**: 20685-20688
- Machesky LM, Insall RH (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current biology : CB* **8**: 1347-1356
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**: 40-46
- Mar FM, Bonni A, Sousa MM (2014) Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO reports* **15**: 254-263
- Marks PW, Kwiatkowski DJ (1996) Genomic organization and chromosomal location of murine Cdc42. *Genomics* **38**: 13-18

- McGraw J, Hiebert GW, Steeves JD (2001) Modulating astrogliosis after neurotrauma. *Journal of neuroscience research* **63**: 109-115
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**: 805-811
- McKerracher L, Ferraro GB, Fournier AE (2012) Rho signaling and axon regeneration. *International review of neurobiology* **105**: 117-140
- McKhann GM, Cornblath DR, Ho T, Li CY, Bai AY, Wu HS, Yei QF, Zhang WC, Zhaori Z, Jiang Z, et al. (1991) Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. *Lancet* **338**: 593-597
- McLeod JG (1981) Electrophysiological studies in the Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology* **9 Suppl**: 20-27
- Medeiros NA, Burnette DT, Forscher P (2006) Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature cell biology* **8**: 215-226
- Mehta NR, Lopez PH, Vyas AA, Schnaar RL (2007) Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *The Journal of biological chemistry* **282**: 27875-27886
- Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**: 93-96
- Mimura F, Yamagishi S, Arimura N, Fujitani M, Kubo T, Kaibuchi K, Yamashita T (2006) Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **281**: 15970-15979
- Montenegro-Venegas C, Tortosa E, Rosso S, Peretti D, Bollati F, Bisbal M, Jausoro I, Avila J, Caceres A, Gonzalez-Billault C (2010) MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Molecular biology of the cell* **21**: 3518-3528
- Moore SW, Correia JP, Lai Wing Sun K, Pool M, Fournier AE, Kennedy TE (2008) Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. *Development* **135**: 2855-2864
- Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chedotal A (2003) The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 9229-9239
- Mori M, Kuwabara S (2011) Fisher syndrome. *Current treatment options in neurology* **13**: 71-78

- Murray A, Naeem A, Barnes SH, Drescher U, Guthrie S (2010) Slit and Netrin-1 guide cranial motor axon pathfinding via Rho-kinase, myosin light chain kinase and myosin II. *Neural development* **5**: 16
- Ngamukote S, Yanagisawa M, Ariga T, Ando S, Yu RK (2007) Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *Journal of neurochemistry* **103**: 2327-2341
- Nicole S, White PS, Topaloglu H, Beigthon P, Salih M, Hentati F, Fontaine B (1999) The human CDC42 gene: genomic organization, evidence for the existence of a putative pseudogene and exclusion as a SJS1 candidate gene. *Human genetics* **105**: 98-103
- Nikolic M (2002) The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *The international journal of biochemistry & cell biology* **34**: 731-745
- Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y, Tigyi G (2002) Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 35840-35846
- Ogawa-Goto K, Kubota K, Kurotani A, Abe T (1994) Antibodies against sulfated glycosphingolipids of peripheral nerve myelins detected in patients with human cytomegalovirus infection. *Journal of neuroimmunology* **55**: 55-60
- Olofsson B (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cellular signalling* **11**: 545-554
- Pak CW, Flynn KC, Bamberg JR (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nature reviews Neuroscience* **9**: 136-147
- Perez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K (2009) The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PloS one* **4**: e8117
- Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* **440**: 1069-1072
- Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**: 1208-1212
- Posse de Chaves E, Sipione S (2010) Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS letters* **584**: 1748-1759
- Press R, Mata S, Lolli F, Zhu J, Andersson T, Link H (2001) Temporal profile of anti-ganglioside antibodies and their relation to clinical parameters and treatment in Guillain-Barre syndrome. *Journal of the neurological sciences* **190**: 41-47
- Prinetti A, Loberto N, Chigorno V, Sonnino S (2009) Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1788**: 184-193

- Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Aguzzi A, Wagner EF, Behrens A (2004) The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* **43**: 57-67
- Riederer BM (2007) Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain research bulletin* **71**: 541-558
- Riento K, Ridley AJ (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 446-456
- Rozes Salvador V, Heredia F, Berardo A, Palandri A, Wojnacki J, Vivinetto AL, Sheikh KA, Caceres A, Lopez PH (2016) Anti-glycan antibodies halt axon regeneration in a model of Guillain Barre Syndrome axonal neuropathy by inducing microtubule disorganization via RhoA-ROCK-dependent inactivation of CRMP-2. *Experimental neurology* **278**: 42-53
- Saijilafu, Hur EM, Liu CM, Jiao Z, Xu WL, Zhou FQ (2013) PI3K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1. *Nature communications* **4**: 2690
- Saijilafu, Hur EM, Zhou FQ (2011) Genetic dissection of axon regeneration via in vivo electroporation of adult mouse sensory neurons. *Nature communications* **2**: 543
- Saijilafu, Zhou FQ (2012) Genetic study of axon regeneration with cultured adult dorsal root ganglion neurons. *Journal of visualized experiments : JoVE*
- Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**: 2083-2085
- Santerre RF, Rich A (1976) Actin accumulation in developing chick brain and other tissues. *Developmental biology* **54**: 1-12
- Schafer DA, Schroer TA (1999) Actin-related proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **15**: 341-363
- Scheib J, Hoke A (2013) Advances in peripheral nerve regeneration. *Nature reviews Neurology* **9**: 668-676
- Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development* **16**: 1587-1609
- Schnaar RL (2010) Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS letters* **584**: 1741-1747
- Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2014) Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological reviews* **94**: 461-518

- Schwarz PM, Liggins JR, Luduena RF (1998) Beta-tubulin isotypes purified from bovine brain have different relative stabilities. *Biochemistry* **37**: 4687-4692
- Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW (2011) Population incidence of Guillain-Barre syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* **36**: 123-133
- Sheikh KA (2011) Autoantibodies activate small GTPase RhoA to modulate neurite outgrowth. *Small GTPases* **2**: 233-238
- Simone IL, Annunziata P, Maimone D, Liguori M, Leante R, Livrea P (1993) Serum and CSF anti-GM1 antibodies in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of the neurological sciences* **114**: 49-55
- Sonnino S, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A (2013) Gangliosides as regulators of cell signaling: ganglioside-protein interactions or ganglioside-driven membrane organization? *Journal of neurochemistry* **124**: 432-435
- Sturgill ER, Aoki K, Lopez PH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, Majic S, Yang WH, Heffer M, Tiemeyer M, Marth JD, Schnaar RL (2012) Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology* **22**: 1289-1301
- Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N (2003) Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Annals of neurology* **54**: 383-388
- Suzuki Y, Nakagomi S, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Inagaki N, Kaibuchi K, Aizawa H, Kikuchi K, Kiyama H (2003) Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat. *Journal of neurochemistry* **86**: 1042-1050
- Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Mansson JE, Rynmark BM (1994) Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochimica et biophysica acta* **1214**: 115-123
- Tan M, Cha C, Ye Y, Zhang J, Li S, Wu F, Gong S, Guo G (2015) CRMP4 and CRMP2 Interact to Coordinate Cytoskeleton Dynamics, Regulating Growth Cone Development and Axon Elongation. *Neural plasticity* **2015**: 947423
- Tanaka EM, Kirschner MW (1991) Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *The Journal of cell biology* **115**: 345-363
- Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI (2008) Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 1925-1930
- Tuszynski JA, Carpenter EJ, Huzil JT, Malinski W, Luchko T, Luduena RF (2006) The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *The International journal of developmental biology* **50**: 341-358

- van den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, van Doorn PA (2014) Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nature reviews Neurology* **10**: 469-482
- van den Ent F, Amos LA, Lowe J (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44
- van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC (2008) Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *The Lancet Neurology* **7**: 939-950
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Sheu SS, Giger RJ (2007) Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. *The Journal of cell biology* **177**: 393-399
- Verhey KJ, Gaertig J (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* **6**: 2152-2160
- Vucic S, Kiernan MC, Cornblath DR (2009) Guillain-Barre syndrome: an update. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **16**: 733-741
- Vyas AA, Patel HV, Fromholt SE, Heffer-Laue M, Vyas KA, Dang J, Schachner M, Schnaar RL (2002) Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 8412-8417
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**: 941-944
- Wang LH, Strittmatter SM (1996) A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**: 6197-6207
- Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. *Journal of molecular biology* **108**: 139-150
- Weisenberg RC, Deery WJ (1976) Role of nucleotide hydrolysis in microtubule assembly. *Nature* **263**: 792-793
- Weisenberg RC, Deery WJ, Dickinson PJ (1976) Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules. *Biochemistry* **15**: 4248-4254
- Wennerberg K, Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of cell science* **117**: 1301-1312
- Willison HJ (2005) The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **10**: 94-112
- Willison HJ, Yuki N (2002) Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain : a journal of neurology* **125**: 2591-2625

- Witte H, Bradke F (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current opinion in neurobiology* **18**: 479-487
- Xiao WD, Yu AX, Liu DL (2014) Fasudil hydrochloride could promote axonal growth through inhibiting the activity of ROCK. *International journal of clinical and experimental pathology* **7**: 5564-5568
- Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature neuroscience* **6**: 461-467
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**: 585-593
- Yang LJ, Zeller CB, Shaper NL, Kiso M, Hasegawa A, Shapiro RE, Schnaar RL (1996) Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 814-818
- Yiu G, He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature reviews Neuroscience* **7**: 617-627
- Yoshino H, Utsunomiya I, Taguchi K, Ariga T, Nagaoka T, Aoyagi H, Asano A, Yamada M, Miyatake T (2005) GalNAc-GD1a is localized specifically in ventral spinal roots, but not in dorsal spinal roots. *Brain research* **1057**: 177-180
- Yu RK, Macala LJ, Taki T, Weinfield HM, Yu FS (1988) Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *Journal of neurochemistry* **50**: 1825-1829
- Yuki N (2007) Campylobacter sialyltransferase gene polymorphism directs clinical features of Guillain-Barre syndrome. *Journal of neurochemistry* **103 Suppl 1**: 150-158
- Yuki N, Hartung HP (2012) Guillain-Barre syndrome. *The New England journal of medicine* **366**: 2294-2304
- Yuki N, Yoshino H, Sato S, Shinozawa K, Miyatake T (1992) Severe acute axonal form of Guillain-Barre syndrome associated with IgG anti-GD1a antibodies. *Muscle & nerve* **15**: 899-903
- Zhang G, Lehmann HC, Manoharan S, Hashmi M, Shim S, Ming GL, Schnaar RL, Lopez PH, Bogdanova N, Sheikh KA (2011) Anti-ganglioside antibody-mediated activation of RhoA induces inhibition of neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 1664-1675
- Zhang G, Lopez PH, Li CY, Mehta NR, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA (2004) Anti-ganglioside antibody-mediated neuronal cytotoxicity and its protection by intravenous immunoglobulin: implications for immune neuropathies. *Brain : a journal of neurology* **127**: 1085-1100
- Zhang Y, Yu LC (2008) Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**: 606-610

